

Funktionelle Charakterisierung der Chemokinrezeptoren CXCR7 und CCR7 in der Pathogenese lymphatischer Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin **Angela Mensen**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
2. Prof. Dr. med. Bernd Dörken
3. PD Dr. Uta E. Höpken

Tag der mündlichen Prüfung: 17.08.2011

Für meinen Vater

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
ALL	Akute lymphozytische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C/EBPβ	<i>CCAAT/ enhancer binding protein beta</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdkn2a	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2a</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
cHL	klassisches Hodgkin Lymphom
Ci	Curie
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
Cy5	Cyanin 5
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	und andere
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
ETP	<i>early thymic progenitor cell</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fgf-1	<i>fibroblast growth factor 1</i>
FRC	<i>fibroblastic reticular cell</i>
g	Gramm
G-418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
GM130	Golgi Matrix Protein 130 kDa
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-

Abkürzungsverzeichnis

GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-
Hgf	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Igf-1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
ITAC	<i>Interferon inducible T-cell alpha chemoat-</i>
<i>i.v.</i>	intravenös
JAK	Janus Tyrosin-Kinase
Kan	Kanamycin
kan ^r	Kanamycin-Resistenz
Kap.	Kapitel
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
loxP	<i>locus of crossing over x in P1</i>
LT	Lymphotoxin
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	<i>number</i>
Neo	Neomycin
neo ^r	Neomycin-Resistenz
NP-40	Nonidet P 40
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex

Abkürzungsverzeichnis

PKB	Proteinkinase B
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.a.	siehe auch
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDF-1	<i>Stromal cell derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interference RNA</i>
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SLO	sekundäre lymphatische Organe
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of tran-</i>
Tab.	Tabelle
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEMED	N.N.N'.N'-Tetramethyldiamin
TBS	<i>tris buffered saline</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	TritonX-100
u.a.	unter anderem
U	units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
Vol.	Volumenanteile
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/ Volumen

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Chemokin - Chemokinrezeptorsystem.....	1
1.1.1	Struktur und Funktion von Chemokinrezeptoren	1
1.1.2	Chemokinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion	2
1.1.3	Homöostatische Chemokinrezeptoren	3
1.2	Die homöostatischen Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und CCR7.....	5
1.2.1	Der Chemokinrezeptor CXCR4	5
1.2.2	CXCR7, ein zweiter CXCL12 bindender Chemokinrezeptor	6
1.2.3	Crosstalk zwischen CXCR4 und CXCR7	7
1.2.4	Der Chemokinrezeptor CCR7	8
1.3	Homöostatische Chemokinrezeptoren in der Neogenese und Homöostase sekundärer lymphatischer Organe	9
1.3.1	Die Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Organe	9
1.3.2	Das Lymphotoxin-System.....	11
1.3.3	Lymphatische Organogenese	12
1.4	Homöostatische Chemokinrezeptoren in der thymischen T-Zellentwicklung.....	14
1.4.1	CXCR4 in der Thymopoese	14
1.4.2	CXCR4 als Kostimulator zur präTCR Signaltransduktion	15
1.5	Homöostatische Chemokinrezeptoren in der Pathogenese lymphatischer Erkrankungen.....	16
1.5.1	Notch1, CXCR4 und die Pathogenese von T-Zell-Leukämien	16
1.5.2	CCR7 in der Dissemination maligner Lymphozyten	18
1.5.3	Das Eμ-Myc Lymphommodell	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	MATERIAL.....	23
2.1	Bakterienstämme	23
2.2	Zellen.....	23
2.3	Mausstämme.....	24
2.4	Plasmide	25
2.5	Oligonukleotide	26
2.6	Antikörper	28
2.7	Puffer und Medien	31
3	METHODEN	34
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	34
3.1.2	Herstellung chemisch bzw. elektrokompetenter <i>E.coli</i>	34
3.1.3	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	35
3.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	35
3.1.5	Isolation von DNA	35
3.1.6	DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung	36
3.1.7	Polymerase-Kettenreaktion	37
3.1.8	Isolierung von RNA und Reverse Transkription	37
3.1.9	Quantitative Real-time PCR-Analyse	37
3.1.10	Restriktionsverdau von DNA und Dephosphorylierung	38
3.1.11	Standard-Agarosegelelektrophorese.....	38
3.1.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
3.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten	39

3.1.14	DNA-Sequenzierung.....	39
3.1.15	Southern-Hybridisierung (Southernblot-Analyse)	39
3.1.16	Klonierungen.....	41
3.2	Proteinbiochemische Methoden	44
3.2.1	Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.2.3	Immunoblot (Westernblot-Analyse).....	45
3.2.4	Zytokin-Antikörper Array	46
3.3	Zellbiologische Methoden.....	47
3.3.1	Kultivierung von Säugerzellen (s.a. Kap. 2.7).....	47
3.3.2	Transfektion von Säugetierzellen.....	47
3.3.3	Transfektion von siRNA in Säugetierzellen	48
3.3.4	Generierung stabiler Zelllinien	48
3.3.5	Isolierung und Kultivierung primärer muriner Zellen.....	48
3.3.6	Isolierung und Kultivierung humaner Leukozyten aus peripherem Blut	50
3.3.7	Isolation und Transfer von E μ -Myc Lymphomzellen.....	50
3.3.8	Generierung von Retroviren.....	51
3.3.9	Retrovirale Transduktion von primären murinen Knochenmarkvorläuferzellen und Transplantation	52
3.3.10	OP9-DL1 Knochenmarkstromazell-Kokulturen	52
3.3.11	E μ -Myc Lymphomzell-Kokulturen	53
3.3.12	Durchflusszytometrie.....	53
3.3.13	Apoptose- und Proliferationsmessungen.....	54
3.3.14	Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie	54
3.3.15	Immunhistologie von Gewebeschnitten	55
3.3.16	Caspase-Aktivierungsassay.....	56
3.3.17	Aktivierungs-induzierte Phosphorylierung von Signaltrans-duktionsproteinen	56
3.4	Knockout-Technik bei Mäusen	57
3.4.1	Kultur primärer embryonaler Fibroblasten	57
3.4.2	Kultur und Transfektion embryonaler Stammzellen	57
3.4.3	Selektion und Isolation embryonaler Stammzellklone.....	57
3.4.4	Superovulation und Präparation von Blastozysten.....	58
3.4.5	Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten und Uterustransfer	59
3.5	Statistische Auswertungen	59
4	ERGEBNISSE	60
4.1	CXCR7 und CXCR4 weisen unterschiedliche Expressionsprofile in der murinen und humanen T-Zell-Entwicklung auf.....	60
4.1.1	CXCR7 und CXCR4 werden in der thymischen T-Zellentwicklung invers exprimiert	60
4.1.2	CXCR7 Protein Expression ist intrazellulär in peripheren T-Zellen nachweisbar	62
4.2	CXCR7 wird in humanen Leukämien und Lymphomen exprimiert.....	65
4.2.1	Humane T-ALL-, T-Lymphom- und klassische Hodgkin-Lymphom-Zelllinien exprimieren CXCR7 ...	65
4.2.2	CXCR7 wird in primären T-ALLs und klassischen Hodgkin-Lymphomen exprimiert.....	66
4.3	CXCR7 unterstützt die intrathymische Differenzierung von thymischen Vorläuferzellen	68
4.4	CXCR7 wirkt zusammen mit CXCR4 als Kostimulator während der thymischen β-Selektion	70
4.4.1	CXCR7 exprimierende DN-Thymozyten erfahren eine effizientere thymische β -Selektion	70
4.4.2	CXCR7 stabilisiert die Oberflächenexpression von CXCR4	73
4.4.3	Die CXCR7-vermittelte Effizienzsteigerung der β -Selektion ist Thymozyten-intrinsisch	75

4.5	CXCR7 verstärkt kooperativ CXCR4-vermittelte Überlebens-signale in Thymozyten	76
4.5.1	CXCR7 und CXCR4 bilden Liganden-unabhängige Heterodimere	76
4.5.2	CXCR7 wirkt kooperativ mit CXCR4 in der Weiterleitung von anti-apoptotischen Signalen <i>in vitro</i> ...	77
4.6	CXCR7 vermittelt Thymozyten Überlebenssignale durch Hochregulierung von anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie.....	79
4.7	Generierung einer konditionellen CXCR7 defizienten Maus.....	81
4.7.1	Identifizierung der genomischen CXCR7-Sequenz	82
4.7.2	Generierung eines konditionellen CXCR7- <i>Targeting</i> -Konstrukts	82
4.7.3	Homologe Rekombination des konditionellen CXCR7- <i>Targeting</i> -Vektors in embryonalen Stammzellen	84
4.7.4	Generierung der konditionellen CXCR7-defizienten Mäuse	85
4.8	Eμ-Myc-Lymphomzellen besitzen ein spezifisches Expressionsprofil an Chemokin- und Adhäsionsrezeptoren	86
4.9	CCR7 reguliert die Migration von Eμ-Myc-Lymphomzellen und Lymphompathogenese <i>in vivo</i>...	87
4.9.1	CCR7 trägt entscheidend zur Lymphompathogenese von E μ -Myc-Lymphomen bei	87
4.9.2	CCR7 vermittelt die Migration von E μ -Myc-Lymphomzellen in sekundäre lymphatische Organe (SLOs).....	88
4.9.3	Die Positionierung von E μ -Myc-Lymphomzellen in der T-Zellzone lymphatischer Follikel ist CCR7-abhängig.....	90
4.10	CCR7 vermittelt Eμ-Myc-Lymphomzellen den Zugang zu Überlebenssignalen <i>in vivo</i>	91
4.10.1	Die CCR7-abhängige Positionierung in lymphatischen Follikeln verschafft E μ -Myc-Lymphomzellen Überlebensvorteile	91
4.10.2	CCR7 induziert anti-apoptotische Signaltransduktionswege in E μ -Myc-Lymphomzellen	92
4.11	Eμ-Myc-Lymphomzell-induzierte reziproke Interaktionen mit T-Zellzonen-Stromazellen begünstigen die Lymphomentwicklung.....	94
4.11.1	E μ -Myc-Lymphomzellen interagieren mit Stromazellen der T-Zellzone	94
4.11.2	E μ -Myc Lymphomzellen induzieren Netzwerke von gp38 ⁺ Stromazellen <i>in vivo</i>	96
4.11.3	gp38 ⁺ Stromazellnetzwerke unterstützen das Überleben von E μ -Myc-Lymphomzellen <i>in vitro</i>	97
4.12	Dendritische Zellen stellen Eμ-Myc-Lymphomzellen Überlebensfaktoren zur Verfügung.....	100
4.12.1	Dendritische Zellen begünstigen E μ -Myc-Lymphomwachstum <i>in vitro und vivo</i>	100
4.12.2	Die E μ -Myc-Lymphomzellmigration in SLOs führt zur veränderten Zusammensetzung an DC-Subtypen <i>in vivo</i>	102
4.12.3	E μ -Myc Lymphomzellen induzieren die Expansion eines putativ regulatorischen immun-supprimierenden DC-Subtyps	103
4.12.4	E μ -Myc-Lymphomzellen induzieren ein Wachstum stimulierendes pro-inflammatorisches und pro-adhäsives Milieu	105
4.12.5	DC produzierte Ihh-Liganden vermitteln Überlebenssignale in E μ -Myc-Lymphomzellen.....	106
5	DISKUSSION.....	110
5.1	CXCR7 wird präferenziell in aktivierten und entarteten T-Zellen exprimiert.....	110
5.2	Eine konstitutive CXCR7 Expression vermittelt selektive Funktionen in hämatopoetischen Zellpopulationen	112
5.3	CXCR7 ist ein anti-apoptotischer Kostimulator während der thymischen β-Selektion	115
5.3.1	CXCR7 verstärkt CXCR4 vermittelte Überlebenssignale	115
5.3.2	CXCR7 und CXCR4 induzierte Überlebenssignale wirken kooperativ	117
5.4	CXCR7 und die Entwicklung von T-Zellleukämien	120

5.5	Zusammenfassung und Ausblick I.....	122
5.6	CCR7 und die Positionierung von Lymphomzellen in Stromazellnischen sekundärer lymphatischer Organe	123
5.7	CCR7 induziert Tumorzell-intrinsische Überlebenssignale	125
5.8	Reziproke Lymphom-Stromazell Interaktionen vermitteln Lymphomzellüberleben	128
5.9	Lymphomzell-induzierte Veränderungen der Stromazellzusammensetzung tragen zum Lymphomwachstum bei	130
5.10	E μ -Myc Lymphomzellen verschaffen sich ein wachstums-förderndes, inflammatorisches Milieu	132
5.11	Zusammenfassung und Ausblick II	135
	LITERATURVERZEICHNIS	138
	ANHANG	156

Zusammenfassung

Homöostatische Chemokin-Chemokinrezeptor Interaktionen sind zentrale Regulatoren der homöostatischen Rezirkulation von Leukozyten im Immunsystem. Darüber hinaus vermitteln sie bedeutende Funktionen in der Embryonalentwicklung, Hämatopoese, lymphatischen Organogenese und Angiogenese. Die Expression von homöostatischen Chemokinrezeptoren auf hämatopoetischen Neoplasien wird zunehmend mit tumorpathogenen Funktionen in Zusammenhang gebracht. Dazu gehört die Stimulation von Tumorzellüberleben, Proliferation und Adhäsion, aber auch die Dissemination in lymphatische Organe. Innerhalb dieser Arbeit wurden Funktionen der Rezeptoren CXCR7 und CCR7 in der Pathogenese lymphatischer Erkrankungen mit Hilfe von Mausmodellen näher charakterisiert.

Wenig war bisher über physiologische und pathophysiologische Funktionen von CXCR7 im hämatopoetischen System bekannt. In dieser Arbeit konnte in der normalen Differenzierung von T-Zellen eine äußerst geringe Expression von CXCR7 in murinen Thymozyten, dagegen eine verstärkte, vor allem intrazellulär lokalisierte Expression in peripheren aktivierten T-Zellen identifiziert werden. Eine aberrante Überexpression von CXCR7 lag in humanen T-ALL und cHL Zelllinien, aber auch in primären humanen akuten T-Zellleukämien und klassischen Hodgkin-Lymphomen vor. Die Analyse eines retroviralen Überexpressionsmodells ergab für CXCR7 die Funktion als anti-apoptotischer Kostimulator während der thymischen β -Selektion. Im Signaltransduktionskomplex mit CXCR4 und dem präTCR vermittelte CXCR7 Überlebenssignale, die zu einem effizienteren DN3-zu-DN4 Übergang führten. CXCR7 exprimierende unreife Thymozyten waren durch eine verstärkte Apoptoseresistenz und Expression von anti-apoptotischen Bcl2-Molekülen charakterisiert. Darauf basierend kann angenommen werden, dass eine Überexpression von CXCR7 in der normalen Thymopoese unreife Thymozyten empfindlicher für die Entwicklung von T-ALLs machen könnte.

Im Zusammenhang der organspezifischen Dissemination von B-Zelllymphomen konnten in der Arbeit des Weiteren bedeutende Funktionen für CCR7 identifiziert werden. Es wurde zunehmend angenommen, dass Überleben und Progression von Lymphomen kritisch von einer Lokalisation innerhalb von Stromazellnischen in sekundären lymphatischen Organen abhängig sind. Unter Verwendung des E μ -Myc Mausmodells konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass E μ -Myc Lymphomzellen CCR7-abhängig in die T-Zellzone von Milz und Lymphknoten einwandern und dort durch reziproke Interaktionen mit gp38⁺ FRCs und DCs entscheidende Überlebenssignale erhalten. Als Stromazell-exprimierte putative Überlebensfaktoren konnten unter anderem Ihh, Igf-1 und VCAM-1 identifiziert werden. Darüber hinaus vermittelten die Lymphomzellen zum eigenen Überlebensvorteil eine aktive Veränderung der Stromazellzusammensetzung, welche durch ein expandiertes FRC Netzwerk, durch die Induktion putativ immunsupprimierender DCs und durch ein inflammatorisches Milieu charakterisiert war. Eine Inhibition der Lymphom - Stromazell Interaktionen könnte zu einem deutlich reduzierten Lymphomwachstum führen und daher eine neue Strategie in der Lymphomtherapie darstellen.

Summary

Homeostatic chemokine-chemokine receptor interactions are centrally involved in the regulation of the homeostatic recirculation of leukocytes within the immune system. Moreover, they exert important functions in embryonic development, hematopoiesis, lymphoid organogenesis and angiogenesis. In recent years the expression of homeostatic chemokine receptors on hematological tumors was increasingly associated with tumor pathogenic functions such as stimulation of tumor cell survival, proliferation and adhesion, but also dissemination into lymphoid organs. Within this thesis, functions of the chemokine receptors CXCR7 and CCR7 in the pathogenesis of lymphoid diseases were characterized using different mouse models.

Thus far, little was known about physiological and pathophysiological functions of CXCR7 within the hematopoietic system. In this work low expression levels of CXCR7 were detected in murine thymocytes during normal T cell development. Enhanced expression was found mainly intracellularly in peripheral activated T cells. An aberrant overexpression was identified in human T-ALL and cHL cell lines and in primary human acute T cell leukemia and classical Hodgkin lymphoma cases. The analysis of a retroviral overexpression model suggested a function of CXCR7 as an anti-apoptotic co-stimulator during thymic β -selection. In a functional complex with CXCR4 and the preTCR CXCR7 mediated survival signals leading to a more efficient DN3-to-DN4 transition. CXCR7 expressing immature thymocytes were characterized by enhanced apoptosis resistance and expression of anti-apoptotic Bcl2-family genes. Thus, it can be hypothesized that an enforced expression of CXCR7 during thymopoiesis could make immature thymocytes more susceptible to develop T-ALL.

In addition, new insights into the function of CCR7 in the context of B cell lymphoma dissemination were gained within this thesis. Lymphoma survival and progression is putatively dependent on the localisation within stromal cell niches of secondary lymphoid organs. Applying the E μ -Myc mouse model, CCR7 was shown to mediate the specific homing of E μ -Myc lymphoma cells into the T cell zone of spleen and lymph nodes. Here, lymphoma cells received pivotal survival signals following reciprocal interactions with gp38⁺FRCS and DCs. Stromally expressed putative survival factors could be identified, amongst them Ihh, Igf-1 and VCAM-1. Moreover, the lymphoma cells induced a survival promoting active remodelling of the T cell zone stroma, which was characterized by an expansion of the FRC network, by the induction of putatively immune suppressive DCs and by the induction of a pro-inflammatory milieu. It is conceivable that an inhibition of lymphoma – stroma cell interactions could significantly reduce lymphoma growth and therefore provide a new strategy in lymphoma therapy.

1 Einleitung

1.1 Das Chemokin - Chemokinrezeptorsystem

1.1.1 Struktur und Funktion von Chemokinrezeptoren

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die durch Bindung an Chemokinrezeptoren die Migration von Zellen entlang von Konzentrationsgradienten im Körper regulieren. Die über 50 bekannten Chemokine stellen hoch basische 6-14 kDa Proteine dar, die von zahlreichen Körperzellen, darunter Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Astrozyten, glatten Muskelzellen und anderen Zelltypen konstitutiv oder induziert sezerniert werden (Nelson und Krensky, 2001; Rossi und Zlotnik, 2000). Durch Bindung an Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche der sezernierenden Zelle kommt es zur Immobilisation des Chemokins und zur Generierung chemotaktischer Gradienten (Potzinger et al., 2006; Proudfoot, 2006). Strukturell werden Chemokine basierend auf der Positionierung der ersten beiden Cysteinreste im Vier-Cystein-Motiv der N-terminalen Aminosäuresequenz in vier Familien (C, CC, CXC und CX₃C) unterteilt (Murdoch und Finn, 2000). So weisen CXC Chemokine eine Aminosäure, CX₃C Chemokine drei Aminosäuren und CC Chemokine keine trennende Aminosäure zwischen den Cysteinen auf. Chemokine vermitteln ihre biologische Funktion durch Bindung an 7-Transmembran G α i Protein-gekoppelte, Pertussistoxin-sensitive Chemokinrezeptoren, die je nach Familie des Liganden ebenfalls in CC und CXC Chemokinrezeptor-Subfamilien unterteilt werden. Insgesamt sind 20 verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt, die spezifisch ein oder mehrere Chemokinliganden binden. Strukturell setzen sich die etwa 350 Aminosäure langen Rezeptoren aus einem extrazellulären, Liganden-bindenden N-Terminus, sieben α -helikalen Transmembrandomänen mit drei intrazellulären und extrazellulären Schleifen sowie einem intrazellulären C-Terminus zusammen (s. Abb. 1).

Funktionell sind Chemokinrezeptoren in zahlreiche biologische Prozesse involviert. Chemokinrezeptoren kontrollieren die homöostatische Rezirkulation von Leukozyten im Immunsystem (Cyster, 1999; Cyster, 2005; Moser et al., 2004) und rekrutieren inflammatorische Zellen in entzündetes Gewebe (Barreiro et al., 2010; Gerard und Rollins, 2001). Darüber hinaus sind Chemokin-Chemokinrezeptor Interaktionen bedeutend in der Embryonalentwicklung (Raz und Mahabaleshwar, 2009; Stumm und Holtt, 2007; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998), Hämatopoese (Broxmeyer, 2008; Juarez und Bendall, 2004; Ma et al., 1998), Angiogenese (Dimberg, 2010; Keeley et al., 2010; Koch et al., 1992; Strieter et al., 1992), in der

Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen (Ansel et al., 2000; Luther et al., 2002; Muller et al., 2003; Randall et al., 2008), HIV-Infektion (Hoffman und Doms, 1998; Suresh und Wanchu, 2006) und an der Metastasierung von Tumoren (Gassmann et al., 2009; Keeley et al., 2010; Murphy, 2001; Richmond et al., 2009; Wang et al., 1998) beteiligt.

1.1.2 Chemokinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Die Stimulation eines Chemokinrezeptors durch Bindung eines spezifischen Liganden induziert in der Regel zahlreiche Signaltransduktionswege, die Migration, Adhäsion und Proliferation vermitteln. Die meisten dieser Signalwege sind abhängig von der Kopplung an heterotriomere G α i-Proteine, die infolge der Rezeptoraktivierung in eine aktive α und $\beta\gamma$ Untereinheit dissoziieren. Für einige Chemokinrezeptoren, wie z.B. CXCR4, sind aber auch G-Protein unabhängige Signalwege bekannt (Abb. 1).

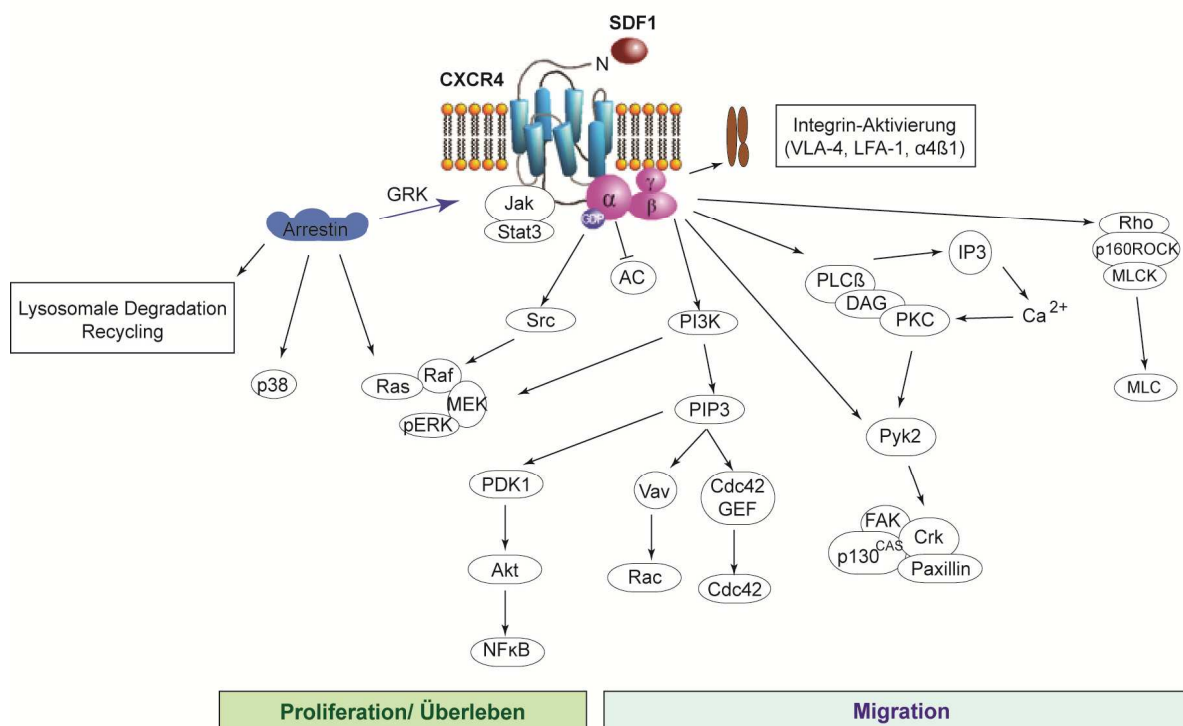


Abb. 1: Signaltransduktionswege und Regulation des Chemokinrezeptors CXCR4 Die Bindung von SDF-1 (CXCL12) an den Rezeptor CXCR4 induziert G-Protein-abhängige und unabhängige Signalwege, die Migration, Integrin-Aktivierung und eine Änderung der Genexpression vermitteln. Die Rezeptorinaktivierung erfolgt durch β -Arrestin induzierte Internalisierung und lysosomale Degradation von CXCR4. SDF1, stromal cell derived factor 1; Jak, Janus Kinase; Stat, signal transducer and activator of transcription; AC, Adenylzyklase; ERK, extracellular activated protein kinase; PLC, Phospholipase C; PKC, Proteinkinase C; GRK, G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase; DAG, Diacylglycerol; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; IP3, Inositol-3,4,5-Trisphosphat; Cdc42, cell division control protein 42; PDK1, 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1; MLCK, myosin light chain kinase; FAK, fokale Adhäsionskinase.

Die freigesetzte Gai-Untereinheit führt allgemein zur Inhibition von Adenylzyklasen und Aktivierung von Src Tyrosinkinasen (Kremer *et al.*, 2003), der $\beta\gamma$ -Komplex dagegen zur Aktivierung der PI3-Kinase γ und der Phospholipase C β (Ganju *et al.*, 1998; Kucia *et al.*, 2004). Die Effektorkinasen dieser beiden Enzyme PKB/Akt und PKC sind an der Vermittlung von Proliferations- und Überlebenssignalen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B beteiligt. Zusätzlich vermitteln die PI3K γ und PLC β zusammen mit der Rho-Familie kleiner GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 und Fokalen Adhäsionskinasen wie FAK und Pyk2 die Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten zwischen Aktin-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix. Auf diesem Weg wird Chemotaxis induziert. (Cotton und Claing, 2009; Schmitz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Pro-proliferative und anti-apoptotische Signalwege werden auch durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie ERK1/2, JNK und p38 weitergeleitet, die über die Rekrutierung von β -Arrestin aktiviert werden (Cheng *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). Zusätzlich werden G-Protein unabhängig Überlebenssignalwege durch die Bindung von Januskinasen an den aktivierten Rezeptor induziert, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Stat-Proteinfamilie führen (Ahr *et al.*, 2005; Vila-Coro *et al.*, 1999). Die Desensitivierung des Chemokinrezeptors erfolgt durch Phosphorylierung der intrazellulären Domänen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und Bindung von β -Arrestin. Die Rezeptor-Arrestin-Komplexe werden anschließend internalisiert, in Endosomen dephosphoryliert und entweder zurück an die Plasmamembran gebracht, oder im Lysosom degradiert (Krupnick und Benovic, 1998; Vroon *et al.*, 2006).

1.1.3 Homöostatische Chemokinrezeptoren

Funktionell lassen sich Chemokinrezeptoren in homöostatische und inflammatorische Chemokinrezeptoren unterteilen. Homöostatische Chemokinrezeptoren wie CXCR4, CXCR5 und CCR7 vermitteln im Allgemeinen die homöostatische Migration und Rezirkulation von Leukozyten in primäre und sekundäre lymphatische Organe. Beispiele hierfür sind die CXCR4 vermittelte Migration von Plasmazellen ins Knochenmark oder die CCR7 vermittelte Einwanderung von dendritischen Zellen (DCs) in drainierende Lymphknoten (Abb. 2). Unreife DCs werden zunächst durch inflammatorische Chemokine wie CCL3, CCL4, CXCL10 und CXCL8, die am Ort einer Entzündung als Antwort auf inflammatorische Zytokine oder nach Pathogenkontakt von Zellen wie Gewebsmakrophagen freigesetzt werden, aktiviert und beginnen in einem sich daran anschließenden Reifungsprozess CCR7 zu exprimieren. Mit Hilfe

von CCR7 wandern die reifen DCs über afferente Lymphgefäße in den Lymphknoten ein, in den auch naive B- und T-Zellen aus dem Blut über CCR7 und CXCR5 rekrutiert werden. Infolge des Kontaktes mit Antigen-präsentierenden DCs beginnen die aktivierten Lymphozyten inflammatorische Chemokinrezeptoren wie CXCR1/2, CXCR3 und CCR5 bei gleichzeitiger Herunterregulation der homöostatischen Chemokinrezeptoren zu exprimieren. Diese vermitteln schließlich die Einwanderung der Lymphozyten in das entzündete Gewebe.

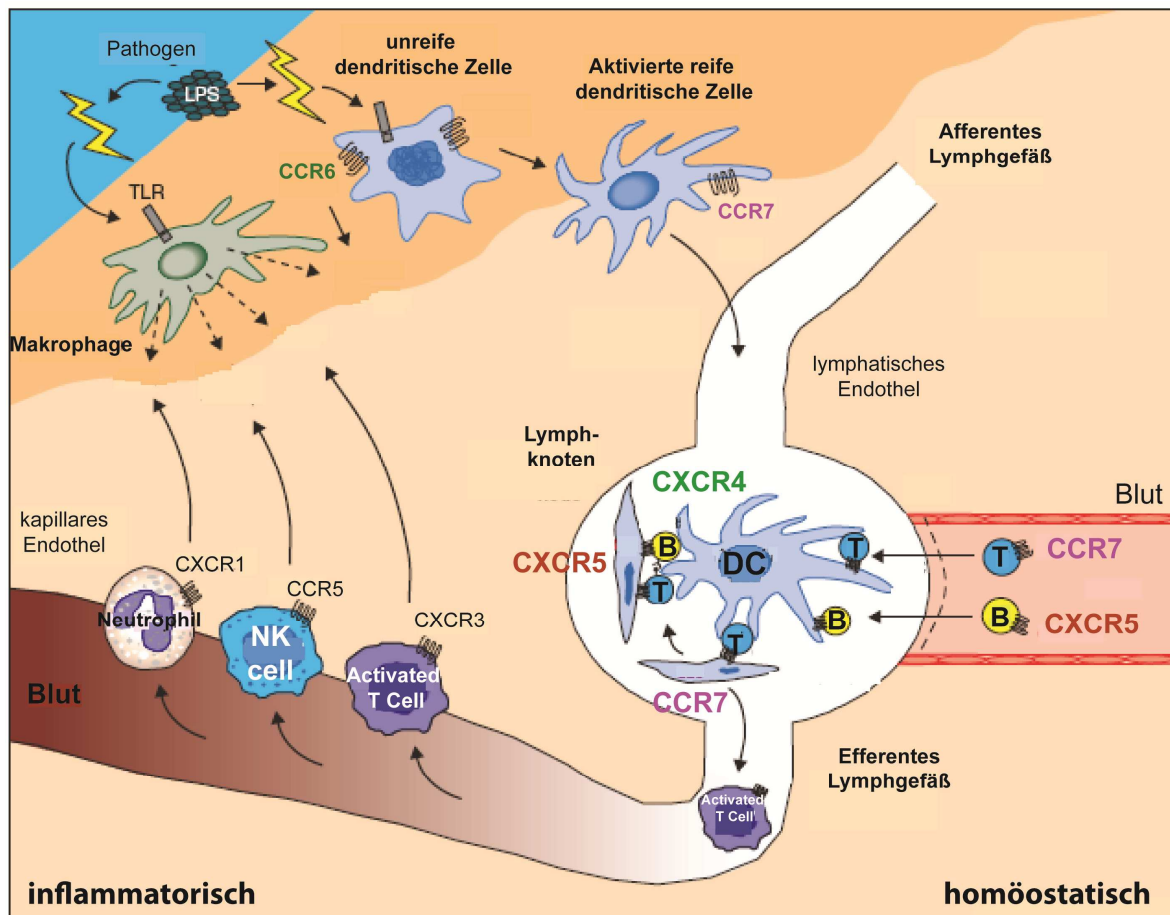


Abb. 2: Die Orchestrierung der Immunantwort durch inflammatorische und homöostatische Chemokinrezeptoren Während inflammatorische Chemokinrezeptoren für die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort einer Entzündung verantwortlich sind, vermitteln homöostatische Chemokinrezeptoren die Migration von Leukozyten in lymphatische Organe. T, T-Lymphozyt; B, B-Lymphozyt; HEV, hoch endotheliale Venole; ELC, CCL19; SLC, CCL21; TLR, toll like receptor; LPS, Lipopolysaccharid (Modifiziert nach Luster, 2002).

1.2 Die homöostatischen Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und CCR7

1.2.1 Der Chemokinrezeptor CXCR4

CXCR4 ist ein hochkonservierter, homöostatischer Chemokinrezeptor, der seine Funktionen über die Bindung des Chemokins CXCL12, auch bekannt als SDF-1 (*stromal cell derived factor 1*), vermittelt. CXCL12 wird in zwei Hauptisoformen, α und β , exprimiert, die alternative Splicevarianten desselben Genes darstellen (Janowski, 2009). CXCL12 β besitzt vier zusätzliche Aminosäuren am C-terminalen Ende und vermittelt vor allem Angiogenese in stark vaskularisierten Organen wie Leber, Milz und Niere. Die prädominante Form von CXCL12 ist jedoch CXCL12 α , welches vor allem durch Stromazellen im Knochenmark, aber auch durch Epithel- und Endothelzellen in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen sezerniert wird. Der Rezeptor CXCR4 wird in der Embryonalentwicklung in zahlreichen Geweben exprimiert, darunter Zellen des Immun- und zentralen Nervensystems (Li und Ransohoff, 2008; Zou et al., 1998). Im Immunsystem sind hohe CXCR4 Expressionslevel vor allem auf Monozyten, B-Zellen, den meisten T-Zellpopulationen und hämatopoetischen Vorläuferzellen vorzufinden (Aiuti et al., 1999).

Ursprünglich wurde CXCR4 durch seine Funktion als Korezeptor in der Infektion von CD4⁺ T-Zellen durch T-trophische HIV-Viren (Feng et al., 1996; Suresh und Wanchu, 2006) bekannt. Untersuchungen an CXCR4 bzw. CXCL12 defizienten Mäusen führten anschließend zur Identifikation weiterer bedeutender Funktionen der CXCL12-CXCR4 Interaktion in der Embryonalentwicklung, Hämatopoese, Angiogenese und Leukozytenmigration (Broxmeyer, 2008; Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998). Da beide KO-Mausstämme den identischen, embryonal letalen Phänotyp an den embryonalen Tagen E15-E17 aufweisen, ging man lange Zeit von einer monogamen Chemokin-Rezeptor Wechselwirkung aus. Der Phänotyp dieser KO-Mäuse ergab, dass CXCL12 und CXCR4 entscheidend in der Embryonalentwicklung von Herz, zentralem Nervensystem und Blutgefäßen beteiligt sind. Des Weiteren vermittelt CXCL12 die Rekrutierung CXCR4⁺ hämatopoetischer Stammzellen aus der fötalen Leber in das Knochenmark und ist für die Retention dieser Zellen im Knochenmark nach der Geburt verantwortlich (Aiuti et al., 1997; Peled et al., 1999). Die verringerte B-Zell-Lymphopoese und Myelopoese in den KO-Mäusen deutete auf bedeutende Funktionen in der Hämatopoese hin. CXCL12 vermittelt z.B. die essentielle Interaktion von

CXCR4⁺ B-Zell Vorläuferzellen, aber auch von Plasmazellen mit Stromazellen des Knochenmarks und ist in der Lage, Prä-B-Zell Proliferation und Überleben zu stimulieren (Egawa et al., 2001; Ma et al., 1999; Tokoyoda et al., 2004). Periphere B-Zellen benötigen CXCR4 später für die Migration in sekundäre lymphatische Organe und für die Organisation von Keimzentren (Allen et al., 2004; Okada et al., 2002). In der T-Zellbiologie ist CXCL12 entscheidend an der Rekrutierung thymischer Vorläuferzellen in den Thymus (Aiuti *et al.*, 1997) und an der intrathymischen T-Zellentwicklung beteiligt (Ara et al., 2003; Janas und Turner, 2010; Trampont et al., 2010).

1.2.2 CXCR7, ein zweiter CXCL12 bindender Chemokinrezeptor

Das Konzept der exklusiven CXCL12-CXCR4 Interaktion wurde im Jahr 2006 erheblich in Frage gestellt, als CXCR7 als zweiter CXCL12 bindender Chemokinrezeptor identifiziert wurde (Burns *et al.*, 2006). Dies machte es erforderlich, CXCL12 vermittelte Funktionen erneut im Kontext eines zweiten spezifischen Rezeptors zu überprüfen. CXCR7 besitzt eine Größe von 362 Aminosäuren und wird durch das *RDC-1*-Gen auf dem Chromosom 1 der Maus und Chromosom 2 des Menschen kodiert, wo auch die Gene für CXCR1, CXCR2 und CXCR4 lokalisiert sind (Libert *et al.*, 1990). Das CXCR7 Gen liegt in der Evolution hoch konserviert vor. So sind murine und humane Sequenzen sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Proteinebene zu über 90% identisch (Heesen *et al.*, 1998). Bindungsstudien ergaben, dass CXCR7 neben CXCL12 auch CXCL11 (ITAC, *interferon inducible t cell alpha chemoattractant*) bindet, welches bekannt ist, seine Funktionen über CXCR3 zu vermitteln. Die CXCR7 Bindungsaffinität für CXCL12 ist jedoch wesentlich höher als die für CXCL11 (Burns *et al.*, 2006).

Während CXCR7 auf mRNA-Ebene in zahlreichen humanen Geweben exprimiert wird, ist Membran-assoziiertes CXCR7-Protein nur auf wenigen Zellpopulationen vorzufinden. Präferenziell wird CXCR7 vor allem auf entarteten Zellen, darunter humane Tumorzelllinien, aber auch primäre humane Tumore wie Lungen-, Brust- und Prostatakrebs exprimiert (Burns et al., 2006; Miao et al., 2007; Wang et al., 2008). Auch Endothelzellen der Neovaskulatur von Tumoren sind durch eine positive CXCR7 Expression charakterisiert (Miao *et al.*, 2007). Physiologisch konnte CXCR7 in Mäusen transient während der Embryonalentwicklung auf fötalen Leberzellen an den Tagen E11-13 nachgewiesen werden (Burns *et al.*, 2006). Dies ist nicht überlappend mit der Expression von CXCR4, die erst am Tag E15 beginnt. Auch verschiedene

humane Leukozytenpopulationen, darunter zirkulierende B-Zellen, T-Zellen, Basophile, Monozyten und reife DCs sollen eine positive CXCR7 Expression aufweisen (Balabanian et al., 2005; Hartmann et al., 2008; Infantino et al., 2006).

Funktionell scheint CXCR7 wichtige Funktionen in der Embryonalentwicklung auszuüben. Zum Beispiel kontrolliert CXCR7 in Zebrafischen die Migrationsrichtung primitiver Vorläuferzellen bei der Ausbildung der posterior-lateralen Organanlagen (Dambly-Chaudiere *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind CXCR7 defiziente Mäuse durch embryonal letale Defekte in der Herzentwicklung charakterisiert (Gerrits et al., 2008; Sierro et al., 2007). Über physiologische Funktionen von CXCR7 in der Hämatopoese und Leukozytenmigration ist dagegen kaum etwas bekannt. Allgemein ergaben *in vitro* Studien, dass CXCR7 exprimierende Zellen durch eine erhöhte Überlebensrate, Adhäsion und Proliferation gekennzeichnet sind. Im Gegensatz zu allen anderen Chemokinrezeptoren ist CXCR7 jedoch nicht in der Lage, an Gai-Proteine zu koppeln und somit eine Calcium vermittelte Migration zu induzieren (Burns *et al.*, 2006). Die CXCR7 Signaltransduktion scheint sich somit von der typischen Chemokinrezeptor-vermittelten Signaltransduktion zu unterscheiden.

1.2.3 Crosstalk zwischen CXCR4 und CXCR7

In den vergangenen Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, dass CXCR7 sowohl inhibitorische, als auch kostimulatorische Effekte auf CXCR4 vermittelte Funktionen ausüben kann. Inhibitorische Effekte basieren auf der Annahme, dass CXCR7 ein nicht-signaltransduzierender *Decoy*-Rezeptor für CXCL12 ist. *Decoy*-Rezeptoren vermitteln durch konstitutive Bindung, Internalisierung und lysosomale Degradation eines Chemokins eine Verringerung der lokalen Chemokinkonzentration und sind somit negative Regulatoren aktiver Chemokinrezeptoren (Comerford und Nibbs, 2005). Die Internalisierung des *Decoy*-Rezeptors ist abhängig von einer Liganden-induzierten Rekrutierung von β -Arrestin-Molekülen, welche für CXCR7 mehrfach nachgewiesen werden konnte (Kalatskaya et al., 2009; Luker et al., 2009; Rajagopal et al., 2010; Zabel et al., 2009).

Andere Studien ergaben dagegen, dass CXCR7 kostimulatorische Funktionen durch Ausbildung von Heterodimeren mit CXCR4 vermittelt. In HEK293 Zellen konnte die Liganden-unabhängige Ausbildung von CXCR7-CXCR4 Heterodimeren mittels FRET und BRET Analysen nachgewiesen werden (Levoye et al., 2009; Sierro et al., 2007). In diesen Heterodime-

ren scheint CXCR7 CXCR4-induzierte Signalwege zu verstärken. Beispiele hierfür sind verstärkte Calciumantworten in HEK293-Zellen (Sierro *et al.*, 2007) und eine verbesserte Integrinaktivierung in humanen T-Zellen in Anwesenheit von CXCR7 (Hartmann *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CXCR7 durch die Bindung von β -Arrestin G-Protein unabhängig Signale wie MAPK-Signalwege aktivieren kann. Auch diese könnten an der Vermittlung der pro-adhäsiven, pro-proliferativen und wachstumsfördernden Eigenschaften von CXCR7 beteiligt sein (Rajagopal *et al.*, 2010).

1.2.4 Der Chemokinrezeptor CCR7

Der Chemokinrezeptor CCR7 vermittelt homöostatische Migrationen von Leukozyten durch Bindung der Chemokinliganden CCL19 und CCL21 (Rot und von Andrian, 2004). Beide werden konstitutiv durch Endothelzellen, retikuläre Stromazellen und andere Zelltypen in lymphatischen Organen exprimiert (Gunn *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998). CCL21 besitzt einen um 32 Aminosäuren verlängerten C-Terminus mit zwölf basischen Aminosäuren, die eine stark aviden Bindung an Glykosaminoglykane wie Podoplanin (gp38) erlauben (Kerjaschki *et al.*, 2004). In sekundären lymphatischen Organen der Maus wird CCL21 von gp38⁺ fibroblastischen retikulären Zellen (FRCs) in der T-Zell reichen Zone und von hochendothelialen Venolen (HEVs) produziert (Carlsen *et al.*, 2005). CCL19 wird dagegen nur von FRCs exprimiert (Link *et al.*, 2007). Unter den Bedingungen einer Entzündung wird angenommen, dass auch aktivierte DCs CCR7 Liganden sezernieren (Sallusto *et al.*, 1999). Der Rezeptor CCR7 wird auf reifen DCs, bestimmten Thymozytenpopulationen, naiven B und T-Zellen, regulatorischen T-Zellen (Treg) und zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) exprimiert (Misslitz *et al.*, 2004; Ohl *et al.*, 2004; Reif *et al.*, 2002; Szanya *et al.*, 2002).

CCR7 vermittelt die Migration von Immunzellen in sekundäre lymphatische Organe und deren Positionierung innerhalb funktioneller Kompartimente. Aktivierte DCs, T- und B-Zellen benötigen CCR7 zusammen mit CD62L (L-Selektin) für die Interaktion und Adhäsion an Endothelzellen von hoch endothelialen Venolen (HEVs), um in Lymphknoten einwandern zu können. Auch in der Milz ist CCR7 essentiell in der Leukozyten-Migration von der roten in die weiße Pulpa involviert (Forster *et al.*, 1999). Innerhalb der sekundären lymphatischen Organe vermittelt CCR7 die Positionierung der Leukozyten in der T-Zell reichen Zone (Bajenoff *et al.*, 2006). CCR7 defiziente Mäuse weisen zahlreiche homöostatische Defekte auf. Lymphknoten sind durch Lymphopenie und fehlende CD11c⁺MHCII^{hoch} DCs charakterisiert. Die

weiße Pulpa der Milz und der Paracortex der Lymphknoten sind strukturell stark desorganisiert (Forster et al., 1999; Ohl et al., 2003). Gleichzeitig entwickeln CCR7 defiziente Mäuse häufig ektope lymphatische Follikel in Schleimhäuten von Magen, Darm und Lunge (Hopken et al., 2007). Da CCR7 auch in der Thymozytendifferenzierung und Reifung involviert ist, sind CCR7 defiziente Mäuse durch verkleinerte medulläre Regionen im Thymus und durch eine gestörte T-Zellentwicklung gekennzeichnet (Misslitz et al., 2004).

1.3 Homöostatische Chemokinrezeptoren in der Neogenese und Homöostase sekundärer lymphatischer Organe

1.3.1 Die Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Organe

In der folgenden Abbildung ist schematisch der Aufbau von Milz und Lymphknoten dargestellt (Abb. 3).

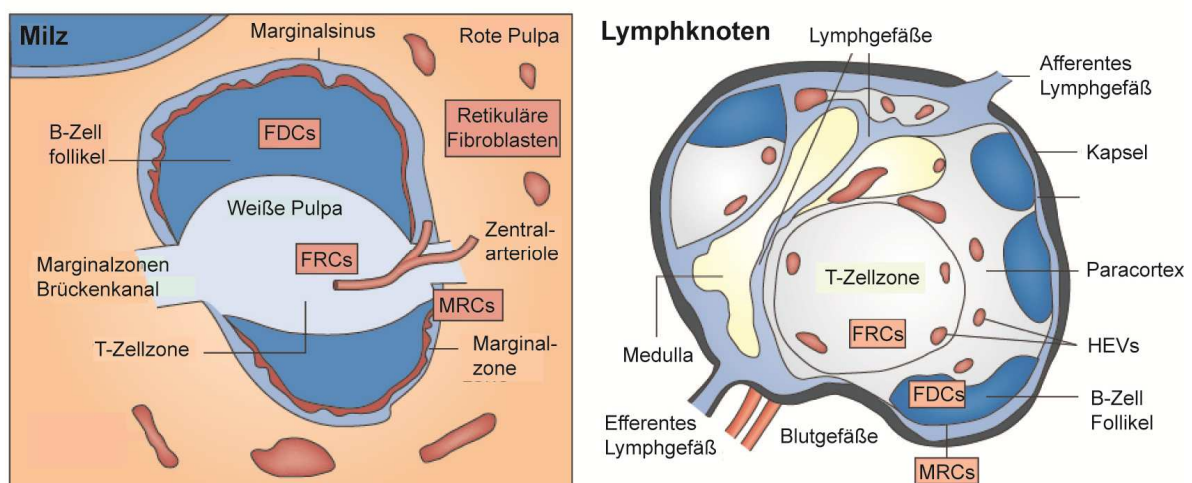


Abb. 3: Die Struktur sekundärer lymphatischer Organe B und T Lymphozyten liegen sowohl in der weißen Pulpa der Milz, als auch in kortikalen Bereichen des Lymphknoten getrennt voneinander in B-Zellfollikeln und T-Zellzonen vor. Während die T-Zellzonen durch gp38+CD31-FRC Netzwerke ausgekleidet und Ort der DC-T-Zell-Interaktion sind, organisieren gp38+/-CD31-FDCs die Struktur von B-Zellfollikeln. FDC, follikuläre dendritische Zelle; FRC, Fibroblastische retikuläre Zelle; MRC, Marginale retikuläre Zelle; HEV, hoch endotheliale Venole (Modifiziert nach Mueller und Germain, 2009).

Die Milz ist ein Blut-filtrierendes Organ, welches sich strukturell aus einer stark durchbluteten roten und einer lymphatischen weißen Pulpa zusammensetzt (Mebius und Kraal, 2005). Arteriell Blut gelangt über die afferente Milzarterie, die sich in zentrale Arteriolen aufteilt, in die rote Pulpa und wird von dort wieder über eine Sammelvene in das Blut zurückgeführt. Die zentralen Arteriolen sind von der weißen Pulpa umgeben, die sich aus T- und B-Zellkompartimenten zusammensetzt. Während in der T-Zellzone, auch PALS (periarteriöläre

Lymphozytenscheide) genannt, T-Zellen mit DCs und passierenden B-Zellen interagieren, findet in B-Zellfollikeln die klonale Expansion aktivierter B-Zellen statt. Eine vergleichbare T- und B-Zellzonensegregation ist auch im Lymphknoten mit einem T-Zell-reichen inneren Paracortex und B-Zellfollikeln im äußeren Cortex vorzufinden (Mueller und Germain, 2009; Turley et al., 2010). In der Milz sind rote und weiße Pulpa durch die Marginalzone voneinander getrennt, in der Marginalzonenmakrophagen, Metallophile Makrophagen, DCs und Marginalzonen B-Zellen lokalisiert sind. Sie ist der Haupteintrittsort, über den Lymphozyten in die weiße Pulpa einwandern (Kraal und Mebius, 2006).

Die T- und B-Zellzonen Segregation ist abhängig von der Expression homöostatischer Chemokine durch B- und T-Zellzonen-spezifische Stromazellpopulationen in Milz und Lymphknoten (Abb. 4).

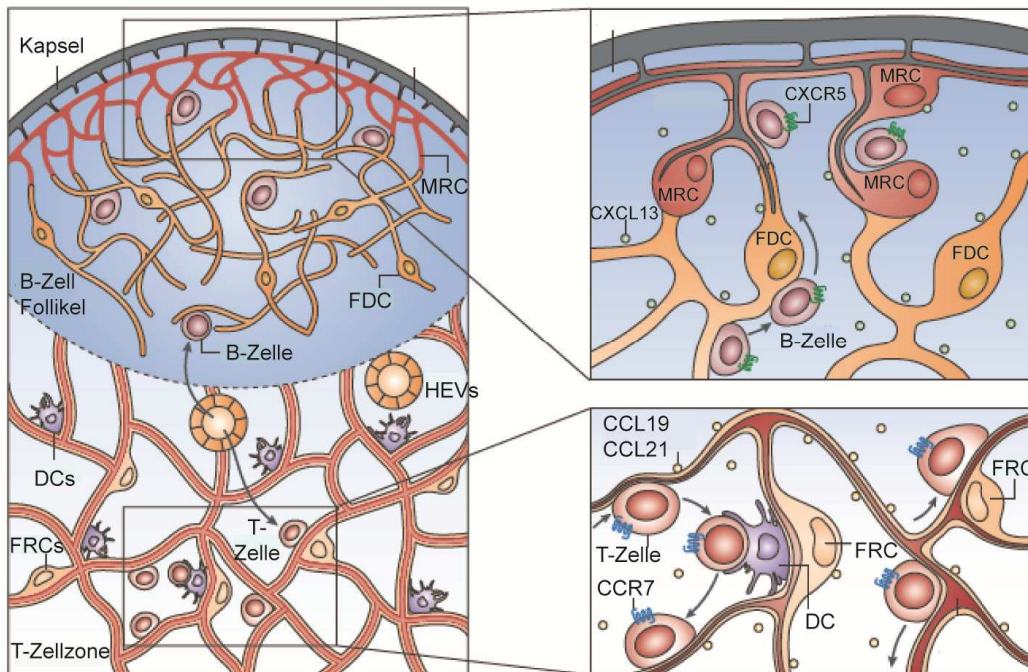


Abb. 4: Chemokinrezeptor-vermittelte B- und T-Zellzonensegregation im Lymphknoten CCR7 vermittelt die Migration aktivierter DCs über afferente Lymphgefäße, sowie naiver T und B-Zellen über CCL21 exprimierende HEVs in die T-Zellzone des Lymphknoten, die durch CCL21/ CCL19 exprimierende FRCs ausgekleidet wird. CXCR5+ B-Zellen wandern durch die T-Zellzone weiter in den B-Zellfollikel, in dem follikuläre Stromazellen wie FDCs CXCL13 exprimieren. FDC, follikuläre dendritische Zelle; FRC, Fibroblastische retikuläre Zelle; MRC, Marginale retikuläre Zelle; HEV, hoch endotheliale Venole; DC, dendritische Zelle; (Modifiziert nach Mueller und Germain, 2009).

Naive T- und B-Zellen wandern CCR7 abhängig über CCL21 exprimierende HEVs in den Lymphknoten ein und gelangen zunächst in die T-Zellzone. Auch aktivierte DCs werden CCR7 abhängig über afferente Lymphgefäße in die T-Zellzone rekrutiert. Diese ist ausgekleidet mit einem Netzwerk von FRCs, die neben CCL21 auch CCL19 exprimieren (Bajenoff et

al., 2006; Bajenoff et al., 2008; Luther et al., 2002). FRCs leiten sich von nicht hämatopoetischen (CD45⁻) mesenchymalen Vorläuferzellen ab und exprimieren den Marker Podoplanin (gp38). Sie bilden zusammen mit retikulären Fasern und Kollagen-reichen extrazellulären Matrix-Bündeln stabile Netzwerke aus, entlang derer die Lymphozyten und DCs tiefer in die T-Zellzone einwandern (Balogh *et al.*, 2008). Während die CXCR5 negativen T-Zellen und DCs in der T-Zellzone verbleiben, wandern die CXCR5 positiven B-Zellen weiter in die B-Zellzone ein, wo B-Zellzonen Stromazellen wie folliculäre DCs (FDCs) den CXCR5 Ligan den CXCL13 exprimieren (Cyster, 2005; Reif et al., 2002). Als einzige T-Zellsubpopulation sind auch CXCR5⁺ folliculäre T-Helferzellen in der Lage, in die B-Zellzone einzuwandern, um dort an der Keimzentrumsreaktion teilzuhaben (Breitfeld *et al.*, 2000). Keimzentrums-B-Zellen exprimieren neben CXCR5 zusätzlich den Rezeptor CXCR4, welcher für die Organisation von Keimzentren in helle und dunkle Zonen verantwortlich ist (Allen *et al.*, 2004).

1.3.2 Das Lymphotoxin-System

Die Aufrechterhaltung der Mikroarchitektur von lymphatischen Organen ist, wie zuvor beschrieben, kritisch von der Expression homöostatischer Chemokine durch spezifische Stromazellen abhängig. Deren Expression wird über das Lymphotoxin (LT)-System reguliert. LT α , ein Mitglied der Tumor-Nekrosis-Faktor (TNF) Familie, wurde zeitgleich mit TNF α entdeckt und daher ursprünglich TNF β genannt (Aggarwal und Natarajan, 1996). LT α ist ein sezerniertes Protein, welches durch Ausbildung von Heterotrimeren mit LT β (LT α 1 β 2) durch die Transmembrandomänen von LT β an die Membran assoziiert wird (Gommerman und Browning, 2003). LT α β vermittelt seine biologischen Funktionen durch Bindung des TNF-Familien Rezeptors LT β R, der zusätzlich den Liganden LIGHT besitzt (Granger und Ware, 2001). Naive B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen sind Hauptquelle von membran-assoziiertem LT, dessen Expression infolge einer Antigen-Aktivierung drastisch erhöht wird (Ware, 2008). Der LT β -Rezeptor wird hingegen auf nicht-hämatopoetischen Stromazellen lymphatischer Organe wie FDCs in der B-Zellzone und FRCs in der T-Zellzone exprimiert (Abb. 5). B-Zell exprimiertes LT vermittelt entscheidend die Aufrechterhaltung des Differenzierungsstatus von FDCs im B-Zellfollikel. Dies garantiert eine konstitutive Freisetzung von CXCL13, welches für die Rekrutierung der B-Zellen im Follikel verantwortlich ist (Cyster, 2010; Gonzalez et al., 1998). Des Weiteren benötigen FDCs die LT β R-Signaltransduktion, um das Adhäsionsmolekül VCAM-1 zu exprimieren, welches den engen Kontakt zu den B-Zellen gewährleistet (Husson

et al., 2000). In der T-Zellzone induziert $CD4^+$ T-Zell, aber auch B-Zell exprimiertes LT in ähnlicher Weise die Expression von CCL19, CCL21 und VCAM-1 durch T-Zellzonenstromazellen wie FRCs und DCs. Dies führt in einer positiven Rückkopplungsschleife zur Rekrutierung von T-Zellen. Zusätzlich wird die $LT\beta R$ -Signaltransduktion für die Homöostase von FRCs und DCs benötigt (De Trez und Ware, 2008; Ngo *et al.*, 2001).

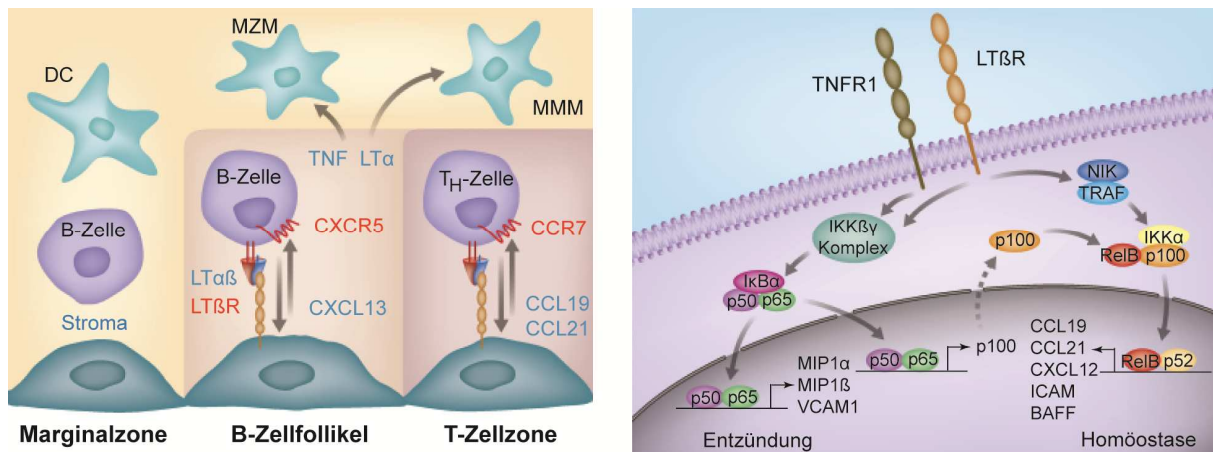


Abb. 5: Die $LT\beta R$ -abhängige Chemokin Expression in der Milz B- bzw. $CD4^+$ TH-Zellen induzieren in der Milz über $LT\alpha\beta$ - $LT\beta R$ Interaktionen die Expression der homöostatischen Chemokine CXCL13 bzw. CCL19 und CCL21 durch Stromazellen der B und T-Zellzone. Deren Expression wird über $LT\beta R$ induzierte NF κ B abhängige Signalwege transkriptionell reguliert. Auch Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1 werden über $LT\beta R$ -abhängige Signale induziert. DC, dendritische Zelle; MZM, Marginalzonen Makrophage; MMM, Metallophiler Makrophage; $LT\beta R$, Lymphotoxin β Rezeptor; TH, T-Helferzelle; TNF(R), Tumor-Nekrose-Faktor (Rezeptor); TRAF, TNF Rezeptor assoziierter Faktor; ICAM, Interzelluläres Adhäsionsmolekül; VCAM, Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül; BAFF, B-Zell Aktivierungsfaktor; MIP, macrophage inflammatory protein (Modifiziert nach Ware, 2008).

Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass der $LT\beta$ -Rezeptor über NF κ B abhängige Signaltransduktionswege die Expression der homöostatischen Chemokine sowie von VCAM-1 induziert (Dejardin *et al.*, 2002). Die Bedeutung des LT-Systems in der strukturellen Integrität sekundärer lymphatischer Organe wird in LT Knockout-Mäusen deutlich, die durch fehlende Lymphknoten, eine gestörte B-/T-Zellsegregation in der weißen Pulpa, durch verringerte Zahlen an DCs, FDCs und Marginalzonenzellen sowie durch ein fehlendes FRC-Netzwerk charakterisiert sind (De Togni *et al.*, 1994; McCarthy *et al.*, 2006; Tumanov *et al.*, 2003).

1.3.3 Lymphatische Organogenese

Das LT-System vermittelt neben der strukturellen Aufrechterhaltung sekundärer lymphatischer Organe im adulten Lebewesen auch deren Embryonalentwicklung (Abb. 6). Sogenannte *Lymphoid tissue inducer* (LTi)-Zellen sind die ersten hämatopoetischen Zellen, die in die An-

lage eines entstehenden Lymphknotens einwandern. Sie sind durch ein $CD45^+CD4^+CD3^-CD11c^-CD127^+CXCR5^+$ Expressionsprofil charakterisiert und exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t. Zusätzlich exprimieren sie IL-7-abhängig LT α 1 β 2, welches mit LT β R-exprimierenden, nicht-hämatopoetischen Stromazellen (sog. „Organizer cells“) interagiert. Die LT β R-Signaltransduktion induziert in den Stromazellen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1, aber auch die Expression von CXCL13, CCL19 und CCL21. CXCL13 vermittelt zum einen die Rekrutierung weiterer CXCR5 $^+$ LTi-Zellen in die Lymphknotenanlage, zum anderen eine CXCR5 induzierte Expression von α 4 β 1 und α 4 β 7 Integrinen auf LTi-Zellen, welche für die Adhäsion der Zellen an die Stromazellen benötigt werden. In den daraus entstehenden Ansammlungen von LTi-Zellen kommt es zur verstärkten LT β R-abhängigen Produktion der homöostatischen Chemokine, die im Folgenden die Differenzierung von HEVs und die Rekrutierung von B und T Lymphozyten vermitteln (Evans und Kim, 2009; Finke et al., 2002; Mebius, 2003).

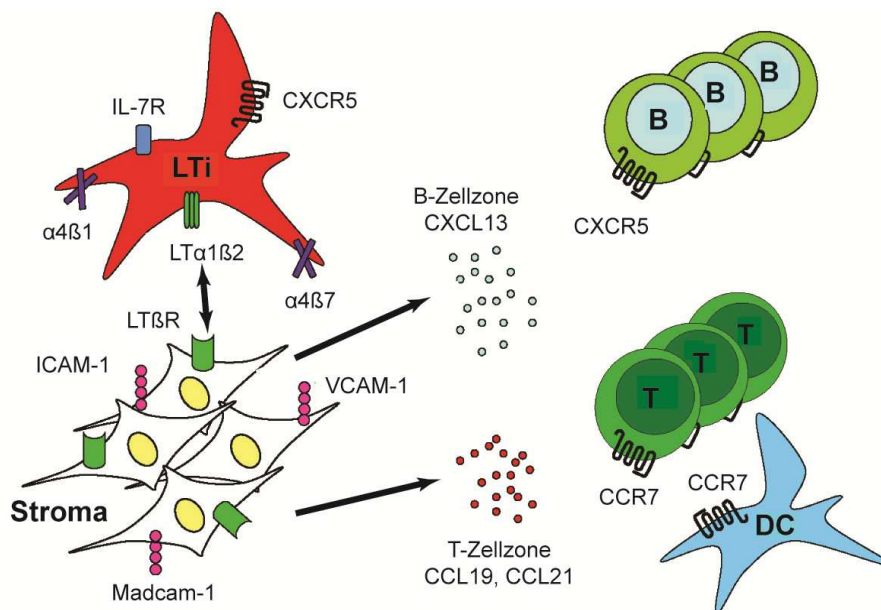


Abb. 6: Die Neogenese sekundärer lymphatischer Organe Die IL-7 induzierte Expression von LT α in LTi-Zellen führt zur reziproken Interaktion mit LT β R-exprimierenden Stromazellen. In den daraus resultierenden LTi-Zellansammlungen kommt es zur verstärkten Freisetzung von CXCL13, CCL19 und CCL21, die die Rekrutierung von B und T-Lymphozyten vermitteln. LTi, Lymphoid tissue inducer; B, B-Zelle; T, T-Zelle; DC, dendritische Zelle; LT β R, Lymphotoxin β Rezeptor; ICAM, Intercellular adhesion molecule, VCAM, Vascular adhesion molecule (Modifiziert nach Evans et. al., 2009).

1.4 Homöostatische Chemokinrezeptoren in der thymischen T-Zellentwicklung

1.4.1 CXCR4 in der Thymopoese

Neben der Regulation der Migration von Leukozyten in sekundäre lymphatische Organe vermittelt der Chemokinrezeptor CXCR4 auch entscheidende Funktionen in der thymischen T-Zellentwicklung (Abb. 7).

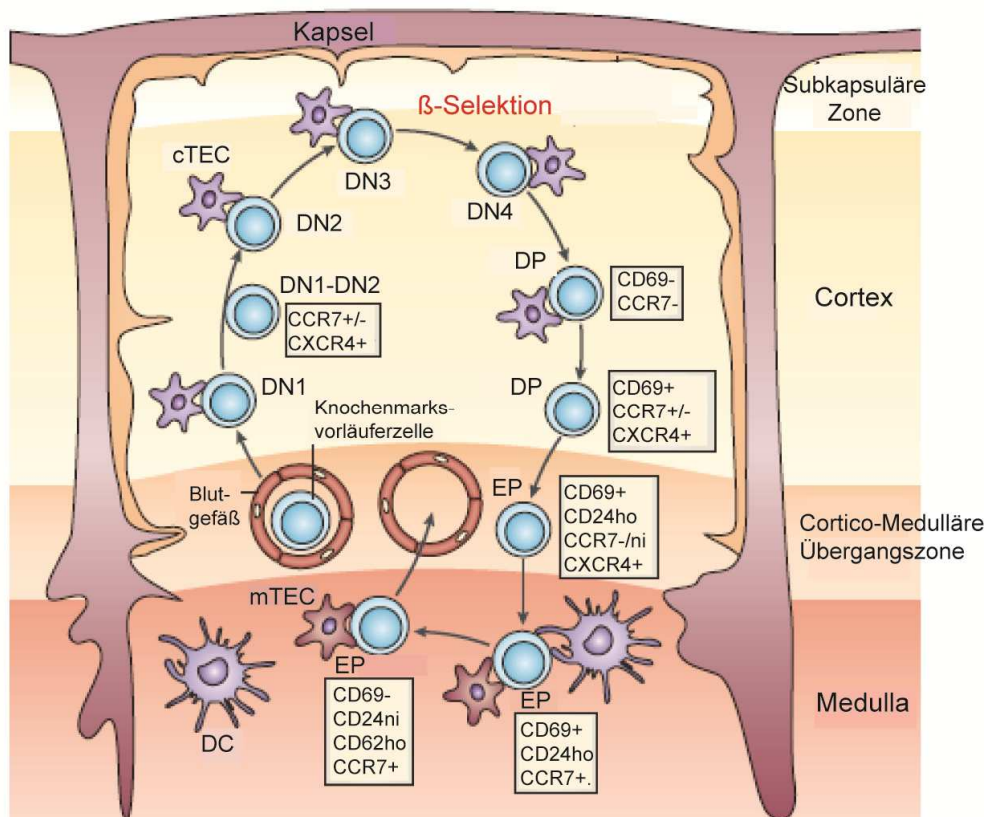


Abb. 7: CXCR4 in der Thymozytenmigration Schematische Darstellung der Chemokinrezeptor-abhängigen Migration von Thymozytenpopulationen innerhalb des Thymus. Während CXCR4 vor allem die Migration von DN Thymozyten von der cortico-medullären Übergangszone in die subkapsuläre Zone des Cortex vermittelt, wird CCR7 für die Migration doppelt-positiver Thymozyten in die thymische Medulla benötigt. DN, doppelt-negativ; DP, doppelt-positiv; EP, einfach-positiv; DC, dendritische Zelle; mTEC, medulläre thymische Epithelzelle; cTEC, cortikale thymische Epithelzelle; ni, niedrig; ho, hoch (Modifiziert nach Förster et. al., 2008).

Thymische Vorläuferzellen, auch ETPs (*early thymic progenitor cells*) genannt, werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und wandern über das Blut in den Thymus ein (Chi et al., 2009; Zlotoff et al., 2008). Die an der cortico-medullären Übergangszone einwandernden Zellen exprimieren zunächst weder CD4 noch CD8 und werden daher

doppelt-negative (DN) Thymozyten genannt. Diese DN1 Thymozyten ($CD25^-CD44^{hoch}$) beginnen von dem inneren Cortex nach außen in die subkapsuläre Zone des Thymus zu wandern und dabei in DN2 ($CD25^+CD44^{hoch}$) und DN3 ($CD25^{hoch}CD44^{niedrig}$) Zellen zu differenzieren (Lind *et al.*, 2001). Die nach außen gerichtete Migration wird vor allem durch CXCR4 entlang steigender CXCL12 Konzentrationen im Cortex (Plotkin *et al.*, 2003; Trampont *et al.*, 2010), möglicherweise aber auch unterstützend durch CCR7 vermittelt (Forster *et al.*, 2008). Auf dem Weg zur subkapsulären Zone beginnen die DN Thymozyten den *tcrβ* Locus zu reorganisieren und die β -Kette mit der präTCR α -Kette (pT α) zum PräTCR-Komplex zusammenzufügen (von Boehmer und Fehling, 1997). DN3 Thymozyten, die erfolgreich den präTCR gebildet haben, bekommen über den präTCR zusammen mit Notch1 induzierten Signalen Überlebenssignale vermittelt, die sie benötigen, um weiter in DN4 Thymozyten ($CD25^-CD44^-$) zu differenzieren (Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005). Der Kontrollpunkt am DN3-zu-DN4 Übergang wird auch als thymische β -Selektion bezeichnet. Die DN4 Thymozyten beginnen zurück in den Cortex zu wandern und in TCR $\alpha\beta$ Antigenrezeptor exprimierende DP-Thymozyten ($CD4^+CD8^+CD69^-$) auszudifferenzieren. Die DP Zellen unterliegen der positiven Selektion im Thymus, bei der es zum Überleben derjenigen Zellen kommt, deren TCR in der Lage ist, MHC-Peptid-Komplexe auf corticalen thymischen Epithelzellen lediglich mit geringer Avidität zu binden (Jameson, 2005). Die positiv selektionierten DP-Thymozyten ($CD4^+CD8^+CD69^+$) wandern CCR7 abhängig vom inneren Cortex in die Medulla, wo sie in unreife CD4 und CD8 einfach positive Thymozyten ($CD24^{int}CD69^+CCR7^{niedrig}$) differenzieren (Forster *et al.*, 2008). In der Medulla kommt es zur negativen Selektion selbstreaktiver Thymozyten, deren TCRs körpereigene Antigene, präsentiert durch MHC-Peptid-Komplexe auf medullären thymischen Epithelzellen, erkennen (Kyewski und Derbinski, 2004). Die überlebenden reifen, einfach-positiven Thymozyten ($CD69^-CD24^{niedrig}CD62^{hoch}$) werden schließlich in die Peripherie entlassen (Forster *et al.*, 2008).

1.4.2 CXCR4 als Kostimulator zur präTCR Signaltransduktion

Als weitere wichtige Funktion von CXCR4 in der thymischen T-Zellentwicklung konnte vor kurzem die Funktion als Ko-Stimulator während der thymischen β -Selektion identifiziert werden. CXCR4 wird auf den Thymozytenstadien DN1 bis DP exprimiert, in einfach-positiven Thymozyten herunterreguliert und auf naiven peripheren T-Zellen wieder reexprimiert (Plotkin *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 1998; Zaitseva *et al.*, 2005). Der Ligand CXCL12

wird hingegen in hoher Konzentration durch einen spezifischen Subtyp von kortikalen Epithelzellen in der subkapsulären Zone des Thymus produziert, wo die β -Selektion stattfindet (Bleul und Boehm, 2000). Die β -Selektion ist durch das Überleben, eine starke Proliferation und weitergehende Differenzierung von DN3 in DN4 Thymozyten charakterisiert. Diese Prozesse sind von einer intakten präTCR und Notch1 Signaltransduktion abhängig. Notch 1 induziert zunächst die Expression der pT α -Kette und leitet anschließend kooperativ mit dem präTCR Überlebenssignale weiter (Ciofani et al., 2004; Reizis und Leder, 2002).

Verschiedene Beobachtungen führten nun zur Entdeckung, dass auch CXCR4 für den DN3-zu-DN4 Übergang benötigt wird. So führte die konditionelle Deletion von CXCR4 im DN2 und DN3 Stadium in *lck*-Cre CXCR4^{fl^{ox}} Mäusen, aber auch die Inhibition von CXCR4 mit dem spezifischen Antagonisten AMD3100 zur Akkumulation von DN2 und DN3 Thymozyten (Janas und Turner, 2010; Trampont et al., 2010). Da die präTCR-Signaltransduktion unabhängig von kortikal exprimierten Liganden erfolgt und sowohl IL-7 (ein wichtiger Wachstumsfaktor in der Thymopoese), als auch der Notch1-Ligand Delta-like 4 im gesamten Thymus exprimiert werden, war der gestörte DN3-zu-DN4 Übergang in *lck*-Cre CXCR4^{fl^{ox}} Mäusen nicht allein auf eine Delokalisation von DN3-Zellen an der subkapsulären Zone zurückzuführen. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass CXCR4 während der thymischen β -Selektion direkt zur Proliferation und Suppression von Apoptose in DN3 Thymozyten durch Verstärkung präTCR induzierter PI3K-Akt, NF κ B und MAPK Signalwege beiträgt (Ahamed und Madhivadani, 2010; Dose et al., 2006; Janas et al., 2010; Mandal et al., 2005; Trampont et al., 2010).

1.5 Homöostatische Chemokinrezeptoren in der Pathogenese lymphatischer Erkrankungen

1.5.1 Notch1, CXCR4 und die Pathogenese von T-Zell-Leukämien

Ungefähr 15 bzw 25% aller neu diagnostizierten Fälle von akuter lymphozytischer Leukämie (ALL) in Kindern bzw. Erwachsenen stellen T-Zellleukämien (T-ALL) dar (Aifantis *et al.*, 2008). Klinisch sind T-ALLs durch eine erhöhte Leukozytenzahl im Blut, eine massive Lymphadenopathie und einem Befall des zentralen Nervensystems charakterisiert. Während früher die Krankheit mit sehr schlechten Prognosen assoziiert war, konnten in den vergangenen Jahren durch verbesserte Chemotherapien deutlich erhöhte Behandlungserfolge erzielt

werden. Dennoch ist die Chemotherapie mit ungewünschten Kurz- und Langzeitnebenwirkungen verbunden, was eine Verbesserung der Therapie erfordert.

Die onkogene Transformation von T-ALLs findet an bestimmten Differenzierungsstadien der Thymozytenentwicklung statt. Die Translokation von Transkriptionsfaktoren in benachbarte Positionen zu Promotor und Enhancer-Sequenzen von TCR-Genen, aber auch die Ausbildung von chimären Proteinen durch Genfusionen vermitteln die Expression von Onkogenen. Gleichzeitig führen kryptische Deletionen zum Verlust von Tumorsuppressorgenen (Graux *et al.*, 2006). Mit zu den wichtigsten onkogenen Ereignissen gehören jedoch aktivierende Mutationen des *Notch1* Gens, welche in 50% aller T-ALLs vorzufinden sind (Weng und Aster, 2004). In der normalen Thymozytenentwicklung wird Notch 1 infolge der präTCR Signaltransduktion herunterreguliert (Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009). Konstitutiv aktive Formen von Notch 1 liegen dagegen in T-ALL Patienten vor. Daraus resultiert eine fortwährende kooperative Signaltransduktion zwischen Notch 1 und präTCR, was zur Induktion onkogener Zielgene führt. Eine konstitutive Notch 1 Aktivität ist somit zentral in der malignen Transformation zahlreicher T-Zellleukämien involviert (Aifantis *et al.*, 2001; Ciofani und Zuniga-Pflucker, 2005; Mandal *et al.*, 2005; Palomero *et al.*, 2006; Palomero *et al.*, 2007; Vilimas *et al.*, 2007).

Die Identifikation von CXCR4 als Kostimulator der PräTCR-Signaltransduktion lässt nun vermuten, dass auch CXCR4 induzierte Signaltransduktionswege zur Pathogenese von T-ALLs beitragen könnten. Für B-Zellleukämien wie B-ALL und B-CLL (chronische lymphozytische Leukämie) konnte bereits gezeigt werden, dass CXCR4 nicht nur die Migration der Zellen ins Knochenmark, sondern auch deren Proliferation und Überleben vermittelt (Bradstock *et al.*, 2000; Burger *et al.*, 1999; Burger *et al.*, 2000). Pathogene Funktionen von CXCR4 in T-Zellleukämien sind dagegen kaum beschrieben. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Migration von Leukämiezellen aus Patienten mit adulter T-Zellleukämie (ATL), welche durch das humane T-lymphotrope Virus Typ I (HTLV-1) verursacht wird, in Anwesenheit des CXCR4 Inhibitors AMD3100 supprimiert wird. Gleiches konnte für lymphozytische Zellen aus HTLV1 *Tax*-transgenen Mäusen beobachtet werden, die unter der Kontrolle des *Tax* Transgens T-Zellleukämien entwickelten (Kawaguchi *et al.*, 2009). In HTLV-1 immortalisierten T-Zellen konnte zusätzlich eine *Tax* induzierte Expression von CXCR7 auf den Tumorzellen nachgewiesen werden, welche mit einem verstärkten Wachstum und Überleben der Zellen assoziiert war (Jin *et al.*, 2009). Für zahlreiche humane solide Tumore wurden bereits

tumorpathogene Funktionen für CXCR7, wie die Stimulation von Tumorzellüberleben, Proliferation und Adhäsion beschrieben (Sun *et al.*, 2010). Zum Beispiel bewirkte die systemische Verabreichung des CXCR7 Antagonisten CCX754 in syngen und xenogenen Tumormodeln eine Verringerung von Tumorstachstum und Tumorstaskularisierung (Burns *et al.*, 2006). Eine ektope CXCR7 Expression war dagegen durch ein verstärktes Tumorstachstum in Nacktmäusen charakterisiert (Miao *et al.*, 2007). Pathogene Funktionen von CXCR7 in hämatopoetischen Neoplasien sind bisher kaum analysiert. Lediglich auf akuten myeloischen Leukämiezelllinien konnte vor kurzem eine CXCR7 Expression nachgewiesen werden (Tarnowski *et al.*, 2010). Funktionen von CXCR7 in der Pathogenese von T-ALLs sind dagegen bisher unbekannt.

1.5.2 CCR7 in der Dissemination maligner Lymphozyten

Die Rezirkulation und spezifische Migration von Lymphozyten in primäre und sekundäre lymphatische Organe wird, wie bereits beschrieben, durch das Expressionsprofil an homöostatischen Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen eines Lymphozyten bestimmt. Ähnlich verhält es sich vermutlich für Leukämie- und Lymphomzellen, die den malignen Gegenpart zu normalen Lymphozyten darstellen. So exprimieren die Tumorzellen abhängig von dem Reifungsgrad, den sie zum Zeitpunkt ihrer malignen Transformation erreicht haben, einige charakteristische *Homing*-Rezeptoren, die eine gewebsspezifische Dissemination der malignen Lymphozyten in lymphatische und nicht-lymphatische Organe vermitteln könnten. Die Dissemination von Lymphomzellen reflektiert somit potentiell ein konserviertes physiologisches Verhalten von Lymphozyten. Anders verhält es sich bei der Metastasierung solider Tumore, in denen es erst im Zusammenhang der Tumorstachstum zur aberranten Expression dieser *Homing*-Rezeptoren kommt (Muller *et al.*, 2001; Pals *et al.*, 2007).

Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre lassen eine Beteiligung von CCR7 an der Dissemination von hämatopoetischen Neoplasien in sekundäre lymphatische Organe vermuten. So konnte gezeigt werden, dass B-Zell Neoplasien, die durch die Präsenz einer klinischen Lymphadenopathie charakterisiert sind, wie z. B. die chronische lymphozytische B-Zellleukämie (B-CLL), hohe Expressionslevel an funktionellem CCR7, CXCR4 und CXCR5 aufweisen (Lopez-Giral *et al.*, 2004; Till *et al.*, 2002). Multiple Myelom (MM) Zellen, die keine noduläre Dissemination besitzen, exprimieren dagegen nur geringe Level an CCR7 und CXCR5 (Lopez-Giral *et al.*, 2004). MM-Zellen sind stattdessen durch eine positive CXCR4

Expression charakterisiert, welche eine Migration der Zellen in das Knochenmark vermittelt (Moller *et al.*, 2003). Auch bei klassischen Hodgkin-Lymphomen (cHL) konnte eine Korrelation zwischen der CCR7 Expression und Lokalisation der Tumorzellen in der paracorticalen T-Zellzone von Lymphknoten festgestellt werden (Hopken *et al.*, 2002). Primäre mediastinale B-Zelllymphome, welche eine extranodale Lokalisation im Mediastinum aufweisen, sind dagegen durch geringe bzw. fehlende CCR7 und CXCR5 Expressionslevel charakterisiert (Rehm *et al.*, 2009). Auch eine aberrante Expression von CCR7 kann zur Dissemination von malignen Lymphozyten beitragen. So konnte gezeigt werden, dass CCR7 infolge der aberranten Notch1 Aktivität in T-ALLs exprimiert wird und für die Infiltration der Leukämiezellen in das zentrale Nervensystem verantwortlich ist (Buonamici *et al.*, 2009).

Es wird angenommen, dass eine Chemokinrezeptor-vermittelte Dissemination in lymphatische Organe entscheidend zur Entstehung und Progression von Leukämien und Lymphomen beitragen könnte. Die Tumorzellen gelangen durch die Dissemination in eine Mikroumgebung, die reich an Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen ist, welche physiologisch Überleben, Proliferation und Differenzierung von normalen Lymphozyten gewährleisten. Die gleichen Mechanismen könnten von den Tumorzellen genutzt werden, um überleben und expandieren zu können. Für eine Vielzahl verschiedener Leukämiezellen im Knochenmark wurde z.B. gezeigt, dass die Tumorzellen durch Wechselwirkungen mit Knochenmarkstromazellen wachstumsfördernde Signale erhalten (Ayala *et al.*, 2009; Colmone *et al.*, 2008; Lwin *et al.*, 2009).

1.5.3 Das E μ -Myc Lymphommodell

Ein geeignetes Modell, um Mechanismen der Dissemination und Pathogenese von B-Zelllymphomen analysieren zu können, ist das E μ -Myc transgene Mausmodell (Adams *et al.*, 1985; Harris *et al.*, 1988). In diesen Mäusen wird das *c-Myc* Onkogen unter der Kontrolle des Enhancers für die schwere Immunglobulinkette E μ in der B-Zelllinie im Knochenmark überexprimiert, was zur Entstehung von Prä- und Pro-B-Zelllymphomen 6-15 Wochen nach der Geburt führt. In der Regel ist deren Entstehung mit der Entwicklung einer Leukämie assoziiert. Das *c-Myc* Gen wurde in diesem Mausmodell gewählt, da in nahezu allen Fällen von Burkitt's B-Zelllymphomen im Menschen, aber auch in induzierten Plasmazytomen von Mäusen Translokationen des *c-Myc* Gens in den Ig-Lokus nachgewiesen werden konnten (Cory, 1986; Klein und Klein, 1985). Die in den Mäusen entstehenden Lymphome sind meis-

tens klonal, weisen aber unterschiedliche Latenzperioden auf, da neben der *c-Myc* Überexpression weitere transformierende Ereignisse auftreten müssen, damit die Zellen entarten (Schmitt und Lowe, 2002). Genetisch und histopathologisch werden die Lymphome in $E\mu$ -*Myc* Mäusen mit humanen B-Zelllymphomen wie Burkitt's Lymphomen, Non-Hodgkin-Lymphomen und vor allem lymphozytischen B-Zellleukämien verglichen. Die Mäuse weisen stark vergrößerte Milzen (2-6 fach) und Lymphknoten (5-50 fach) auf, in denen die normalen Lymphozyten fast vollständig durch die Tumorzellen verdrängt sind.

Da das *c-Myc* Onkogen nicht nur pro-proliferative, sondern auch pro-apoptotische Effekte vermittelt (Nilsson und Cleveland, 2003), sind $E\mu$ -*Myc* Lymphomzellen *in vitro* hoch apoptotisch. Innerhalb von sekundären lymphatischen Organen scheinen sie jedoch Überlebenssignale zu erhalten und zu expandieren. Mechanistisch konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Hedgehog-Liganden, die durch Stromazellen in sekundären lymphatischen Organen produziert werden, in der Lage sind, Überleben und Proliferation von $E\mu$ -*Myc*-Lymphomzellen *in vitro* zu vermitteln (Dierks *et al.*, 2007) (Abb. 8).

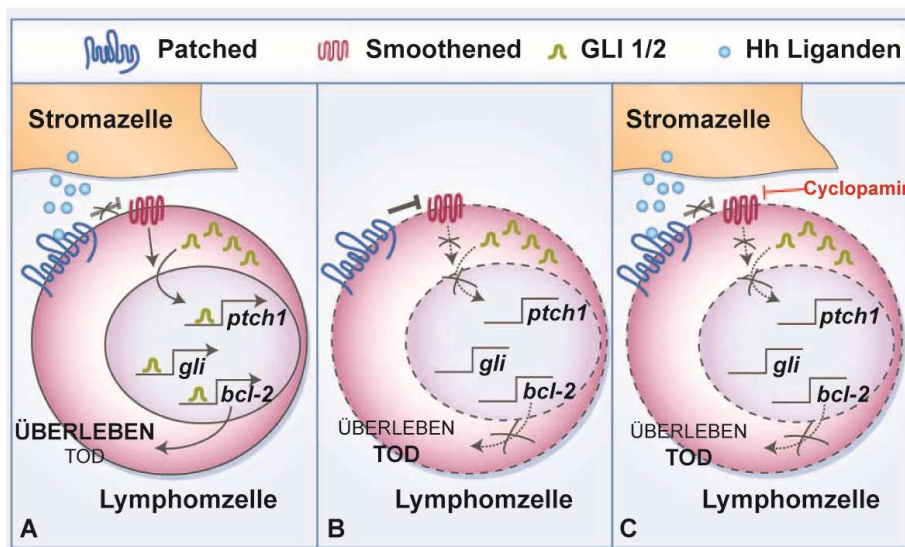


Abb. 8: Stroma-induzierte Hedgehog-Signaltransduktion in $E\mu$ -*Myc* B-Zell Lymphomen (A) Die Bindung von Stroma-exprimierten Hedgehog-Liganden an den Rezeptor Patched vermittelt eine Aufhebung der Ptc1 vermittelten Suppression von Smoothened. Dies führt zur Aktivierung von GLI-Transkriptionsfaktoren und zur Expression von Zielgenen wie *ptch1*, *gli* und *bcl-2*. Die erhöhten *bcl-2*-Level bewirken wiederum ein verstärktes Lymphomzellüberleben. (B) In Abwesenheit von Hh-Liganden wird Smoothened durch Ptc1 supprimiert und führt somit zum Zelltod. (C) Die Inhibition von Smoothened durch Cyclopamin führt ebenfalls zu einer Herunterregulation von *bcl-2* und somit zum Tod der Lymphomzelle. Ptc, Patched (Modifiziert nach Lindemann, 2008).

Die Hedgehog-Signaltransduktion ist vor allem in der Embryonalentwicklung bekannt, besitzt aber auch wichtige Funktionen in der Pathogenese zahlreicher humaner Tumore (Rubin und de Sauvage, 2006). In Säugetieren sind drei Hh-Liganden bekannt, *Sonic hedgehog* (Shh), *Indian*

Hedgehog (Ihh) und *Desert Hedgehog* (Dhh), welche den *Patched*-Rezeptor Ptch1 binden. Die Bindung blockiert die Inhibition des heptahelikalen Transmembranrezeptors *Smoothened* durch Ptch1 und führt zur Aktivierung von Zinkfinger Gli-Transkriptionsfaktoren. Diese wiederum induzieren die Expression von Zielgenen wie *ptch1*, *gli*, einigen pro-proliferativen Cyclinen und anti-apoptotischem *bcl-2* (Kalderon, 2005; Lum und Beachy, 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Identifikation von CXCR7 als zweiten CXCL12 bindenden Chemokinrezeptor hat zahlreiche Fragestellungen hinsichtlich der Funktion dieses Rezeptors in CXCL12 abhängigen Prozessen aufgeworfen. Im Immunsystem sind diverse Funktionen in der Hämatopoese, aber auch in der Pathogenese hämatopoetischer Neoplasien als CXCR4-abhängig beschrieben worden. Welche Rolle CXCR7 in diesen Prozessen spielt, ist dagegen völlig unbekannt. Es wurde postuliert, dass CXCR7 keine hämatopoetischen Funktionen besitzt, da CXCR7-defiziente Mäuse eine normale fötale Hämatopoese aufweisen. Die Hämatopoese im adulten Tier wurde dagegen nicht näher analysiert. Auch eine Expression von CXCR7 auf hämatopoetischen Neoplasien und potentiell pathogene Konsequenzen sind bisher kaum bekannt.

Um einen Einblick in physiologische und pathophysiologische Funktionen von CXCR7 vor allem in der T-Zellentwicklung gewinnen zu können, sollte in der Arbeit zunächst die Expression von CXCR7 erneut in T-Zellpopulationen verifiziert, aber auch neu in T-Zell-Neoplasien analysiert werden. Die Identifikation CXCR7 abhängiger Funktionen sollte anschließend zum einen durch die Generierung einer konditionellen KO-Maus erfolgen. Zum anderen sollte CXCR7 mit Hilfe eines retroviralen Systems konstitutiv überexprimiert und dessen Einfluss auf CXCR4 vermittelte Funktionen im hämatopoetischen System analysiert werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie galt es die Folgen der Deletion oder konstitutiven Überexpression von CXCR7 auf Immunzellpopulationen zu charakterisieren. Zusätzlich sollten die Befunde *in vitro* mechanistisch näher aufgeklärt werden.

Neben dem CXCR7 Projekt sollten in einem weiteren Vorhaben pathogene Mechanismen einer CCR7 vermittelten Dissemination von B-Lymphomzellen in sekundäre lymphatische Organe (SLOs) charakterisiert werden. Mehrere klinische Studien hatten eine Korrelation zwischen CCR7 Expression und Lokalisation von B-Zelllymphomen in SLOs ergeben. Die pathogenen Konsequenzen der CCR7 vermittelten Dissemination innerhalb der SLOs wurden

dagegen *in vivo* bisher nicht näher analysiert. Aus diesem Grund war in der Arbeitsgruppe ein neues Mausmodell durch Kreuzung des E μ -*Myc* transgenen Mausstammes mit CCR7 defizienten Mäusen etabliert worden. Mit Hilfe dieser E μ -*Myc* transgenen bzw. CCR7^{-/-}/ E μ -*Myc* doppelt-transgenen Mäuse konnte gezeigt werden, dass E μ -*Myc*-Lymphomzellen CCR7-abhängig in die T-Zellzone von SLOs einwandern und dort entscheidende Überlebenssignale erhalten. Es wurde vermutet, dass Interaktionen mit T-Zellzonen Stromazellen für das Überleben der Lymphomzellen verantwortlich sind, die zugrunde liegenden Mechanismen waren jedoch unbekannt.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit war es daher das Ziel, CCR7 abhängige Mechanismen, die zum Überleben der E μ -*Myc* Lymphomzellen in der T-Zellzone beitragen, zu charakterisieren. Hierfür sollte zunächst grundlegend festgestellt werden, ob Stromazellpopulationen der T-Zellzone wie FRCs und DCs den Lymphomzellen Überlebenssignale vermitteln. Anschließend sollten Identität und zugrunde liegende Mechanismen dieser Überlebenssignale näher analysiert werden.

2 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Clontech (Palo Alto, USA), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), NEB (Schwalbach), NEN (Köln), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.1 Bakterienstämme

E.coli XL-1 blue (Stratagene): *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1*, *LacF'*[*proAB*⁺, *LacI*^qZΔM15, Tn10(*tet*^r)]

E.coli DH5α (Stratagene): F⁻, φ80d*LacZ*ΔM15, Δ(*LacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*^{*}), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, λ⁻

E.coli DH10B (Liu *et al.*, 2003): F⁻, *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), φ80d*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ(*ara, leu*)7649, *ga/U*, *ga/K*, *rspL*, *nupG*

E.coli EL350 (Liu *et al.*, 2003): DH10B [λcl857 (*cro-bioA* < > *araC-P_{BADcre}*)]

2.2 Zellen

Zelllinien

HEK293A	humane embryonale Nierenepithelkarzinomzelllinie	ATCC	CRL-1573
NIH3T3	murine embryonale Fibroblastenzelllinie	DSMZ	ACC-59
Jurkat	humane T-ALL Zelllinie	DSMZ	ACC-282
MOLT14	humane T-ALL Zelllinie	DSMZ	ACC-437
ALL-SIL	humane T-ALL Zelllinie	DSMZ	ACC-511
SupT1	humane T-lymphoblastische Lymphomzelllinie	DSMZ	ACC-140
LOUCY	humane T-ALL Zelllinie	DSMZ	ACC-394
RPMI-8402	humane T-ALL Zelllinie	DSMZ	ACC-290
KM-H2	humane Hodgkin-Lymphomzelllinie	DSMZ	ACC-8
L428	humane Hodgkin-Lymphomzelllinie	DSMZ	ACC-197
L591	humane Hodgkin-Lymphomzelllinie	DSMZ	ACC-602
L1236	humane Hodgkin-Lymphomzelllinie	DSMZ	ACC-530

HEK293A-Zellen, die stabil mit murinen (m) oder humanen (hu) CXCR7 transfiziert sind, wurden freundlicherweise von Susann Winter (AG Dr. Martin Lipp, MDC Berlin) zur Verfügung gestellt (mCXCR7) bzw. innerhalb der vorliegenden Arbeit generiert (huCXCR7). Diese wurden für die Etablierung von CXCR7-Antikörpern verwendet. Die murine Thymozytenzelllinie SCB.29 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Harald von Boehmer (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Als retrovirale Verpackungszelllinie wurden humane PlatE-Zellen verwendet, freundlicherweise von Prof. Dr. Wolfgang Uckert (MDC Berlin) zur Verfügung gestellt. Die murine Knochenmarkstromazelllinie OP9-DL1, die stabil den Notch-1 Liganden Delta-like 1 exprimiert, wurde dankend von PD Dr. Uta E. Höpken (MDC, Berlin) erhalten.

Für die ES Zellkultur wurde die embryonale Stammzelllinie C2, die aus Blastozysten der C57BL/6NTac Mauslinie stammt, verwendet (Andras Nagy, MSHRI, Toronto, Kanada). Neomycin-resistente embryonale Fibroblasten, die aus Kreuzungen von Wildtyptieren mit transgenen Neomycin-homozygoten Mäusen stammten, wurden ebenso wie die ES Zelllinie freundlicherweise von Prof. Dr. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin) zu Verfügung gestellt.

2.3 Mausstämme

C57BL/6 Wildtyp (CD45.2+), C57BL/6 Ly5.1 (CD45.1+) kongene und E μ -Myc (C57BL/6) transgene Mäuse (Adams, et. al., 1985) wurden von Charles River (Wilmington, MA, USA) bzw. Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. CCR7^{-/-} Mäuse (Forster *et al.*, 1999) wurden in den C57BL/6 Hintergrund über zwölf Generationen zurückgekreuzt. Durch Kreuzung von CCR7^{-/-} Mäusen mit E μ -Myc transgenen Mäusen wurde ein doppelt transgener Stamm generiert. Der CD11c.DTR transgene Mausstamm (C57BL/6) wurde dankend von N. Garbi (DKFZ, Heidelberg) erhalten.

2.4 Plasmide

Tab. 1: Ausgangsvektoren

Vektor	Referenz	Beschreibung
pcDNA3.1(-)	Invitrogen	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r Neo ^r
pEGFP-N3	Clontech	Eukaryotischer Expressionsvektor mit GFP-tag 3' der MCS, Neo ^r Kan ^r
pIRES2-EGFP	Clontech	Eukaryotischer Expressionsvektor mit IRES-EGFP 3' der MCS, Neo ^r Kan ^r
pSP72	Promega	Klonierungsvektor im bakteriellen System, Amp ^r
pCMV-Sport6	RZPD	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r
pCMV6-XL5	Origene	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r
pCMV6-Entry	Origene	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Myc/Flag-tag 3' der MCS, Amp ^r
pBluescript II SK(+)	H. Wende ¹⁾	Klonierungsvektor im bakteriellen System, Amp ^r , DTA Gen 5' des HSV-TK-
- DTA		Promotors
pHW025	H. Wende ¹⁾	Klonierungsvektor im bakteriellen System, Neo ^r
mini lambda tet	Court, et. al 2003	Derivat der zirkulären DNA des Phagen λ, Tet ^r

Tab. 2: Expressionsplasmide

Plasmid	Referenz	Beschreibung
pMSCV2.2-bcl2-IRES-EGFP	C. Schmitt ²⁾	murine bcl2 cDNA im retroviralen Vektor pMSCV2.2-IRES-EGFP, Amp ^r
pCMV-Sport6-mCXCR7	RZPD	murine CXCR7 cDNA mit 5' und 3' UTR Sequenzen im Vektor pCMV-Sport6
pCMV6-XL5-hCXCR7	Origene	humane CXCR7 cDNA im Vektor pCMV6-XL5
pCMV6-Entry-hCXCR7	Origene	humane CXCR7 cDNA mit 5' und 3' UTR Sequenzen, Myc/Flag-Tag 3' der MCS, Amp ^r

In dieser Arbeit generierte Expressionsplasmide

pcDNA3.1(-)-CXCR7-Sonde ^{int}	400 bp Sequenz innerhalb des murinen CXCR7 Exon 2 im Vektor pcDNA3.1 (-)
pcDNA3.1(-)-CXCR7-5'-Sonde	genomische 700 bp Sequenz des BAC Klon RP24-112C5, 2717 bp 5' des murinen CXCR7 Exon 2 im Vektor pcDNA3.1(-)
pcDNA3.1 (-)-CXCR7-3'-Sonde	genomische 700 bp Sequenz des BAC Klon RP24-112C5, 5645 bp 3' des murinen CXCR7 Exon 2 im Vektor pcDNA3.1(-)
pSP72-hCXCR7	humane CXCR7 cDNA im Vektor pSP72
pMSCV2.2 -hCXCR7-IRES-EGFP	humane CXCR7 cDNA im retroviralen Vektor pMSCV2.2-IRES-EGFP
pMSCV2.2-IRES-EGFP	Retroviraler Vektor pMSCV2.2-IRES-EGFP ohne cDNA
pIRES2-EGFP-hCXCR7	humane CXCR7 cDNA im Vektor pIRES2-EGFP

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

¹ Dr. Hagen Wende (AG Prof. Dr. Carmen Birchmeier, MDC Berlin)

² Prof. Dr. Clemens Schmitt (Charité, Virchow-Klinikum, Berlin)

2.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez GmbH (Berlin-Buch) bezogen. Unterstrichene Basenabschnitte kennzeichnen Restriktionsschnittstellen.

Tab. 3: Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz
T7	5'TAATACGACTCACTAGGG 3'
SP6	5'GATTAGGTGACACTATAG 3'
pDTA-ABCD forw	5'TGGAAACATTCCAGGCCTGG 3'
pDTA-ABCD rev	5'AACAAAAGCTGGAGCTCGGC 3'
pHW025-EF rev	5'GAAGGCCCGAGGGCTCGCAGC 3'
pHW025-GH forw	5'ACAAATAGGGGTTCCGCGCA 3'
pHW025-IJ rev	5'GAAGGCCCGAGGGCTCGCAGC 3'
pHW025-KL forw	5'ACAAATAGGGGTTCCGCGCA 3'
5'pDTA-gen.sub. rev	5'AGGAAGTGGACGCAGAAAGA 3'
KL-intern-3'-1.loxP rev	5'TCA GCATGATACAGGGTCCA 3'

Tab. 4: Primer für Klonierung der Rekombinationsvektoren

Name	Sequenz
CXCR7-KO Pr. A XhoI-SalI forw	5'CCGCTCGAGGTCGACCAGCCTCCATGACTGACT 3'
CXCR7-KO Pr. B HindIII rev	5'CCCAAGCTTTGGGAAGGAACCAAGGCA 3'
CXCR7-KO Pr. C HindIII forw	5'CCCAAGCTTCACAGCGTCTGAGATTCA 3'
CXCR7-KO Pr. D SpeI rev	5'GACTAGTTTGCCGTGCCAACATACA 3
CXCR7-KO Pr. E XhoI forw	5'CCGCTCGAGTAATTCTCCATGGAGCTA 3'
CXCR7-KO Pr. F EcoRI-HindIII rev	5'GGAATTCAAGCTTATTATTGCTATTCAAGCAAAA 3
CXCR7-KO Pr. G NotI forw	5'AATGCGGCCGCGGGGTGGGGAGATAAGGA 3'
CXCR7-KO Pr. H SacII-XhoI rev	5'TCCCCGCGGCTCGAGGGACCTGCCTGTGAACCA 3'
CXCR7-KO Pr. I XhoI forw	5'CCGCTCGAGTGACAAGGGCAATTGTCC 3'
CXCR7-KO Pr. J HindIII-EcoRV rev	5'CCCAAGCTTGATATCAGGACTGTACCCCAAAC 3'
CXCR7-KO Pr. K NotI forw	5'AATGCGGCCGCGGGGAAGCAGAGGATCCG 3'
CXCR7-KO Pr. L NotI-XhoI rev	5'AATGCGGCCGCTCGAGACATGGTGCTGGGGAGGG 3'

Tab. 5: Primer für Klonierung der Expressionsplasmide

Name	Sequenz
5'Sonde CXCR7/BAC/HindIII forw	5'CCCAAGCTTATCTTCGTTTTTGTTC 3'
5'Sonde CXCR7/BAC/EcoRI rev	5'GGAATTCAAAACCAAAGAAAGAAC 3'
3'Sonde CXCR7/BAC/HindIII forw	5'CCCAAGCTTCGCGCCATGTGGCGGGCA 3'
3'Sonde CXCR7/BAC/EcoRI rev	5'GGAATTCCTGTCCCTGGGCCTGCCCTGC 3'
hCXCR7-BglII forw	5'GAAGATCTATGGATCTGCATCTCTTC 3'
hCXCR7-EcoRI rev	5'GAGAATTCTCATTGGTGCTCTGCTC 3'

Tab. 6: Primer zur Genotypisierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Name	Sequenz
CXCR7-KO-EF-neo forw	5'TCCTGTAAAGGGCTTGATGC 3'
CXCR7-KO-EF-neo rev	5'CGTTGGCTACCCGTGATATT 3'
CXCR7-KO-EF-GH rev	5'GTCAACCGAGCCTTCAGATG 3'

Tab. 7: Real-Time PCR Primer

Name	Sequenz	Annealing (°C)	MgCl ₂ (mM)	Primerkonz. (µM)
GAPDH forw	5'AACCTTGGCATTGTGGAAGG 3'	65,2	2,5	0,25
GAPDH rev	5'ACACATTGGGGGTAGGAACA 3'			
CCL19 forw	5'AGACTGCTGCCTGTCTGTGA 3'	66,4	2,5	0,25
CCL19 rev	5'TGCTGTTGCCTTTGTTCTTG 3'			
CCL21 forw	5'GGGCTGCAAGAGAACTGAAC 3'	59	3,0	0,2
CCL21 rev	5'CCGTGCAGATGTAATGGTTG 3'			
CXCL12 forw	5'CTTCCACCAGAGCAGAGTCC 3'	66,5	2,0	0,5
CXCL12 rev	5'GTTTGGAGGCAAGCAGAGAG 3'			
Shh forw	5'ATGAATCCAAAGCTCACATCCA 3'	60	2,5	0,25
Shh rev	5'CGGTCTCCGGGACGTAAGT 3'			
Ihh forw	5'GTCAAGTCTGAGCATTCGGC 3'	60	2,5	0,25
Ihh rev	5'CCTGGCTTTACAGCTGACAG 3'			
mCXCR7-for	5'GGTCAGTCTCGTGACGATA 3'	60	2,5	0,25
mCXCR7 rev	5'GTGCCGGTGAAGTAGGTGAT 3'			
hCXCR7 for	5'CTCATCTTCTCCATCAACCTCTTC	60	2,5	0,25
hCXCR7 rev	5'GCCTTCATCAGCTCGTACCTGTAG			
CXCR4 forw	5'TCAGTGGCTGACCTCCTCTT 3'	60	3,5	0,25
CXCR4 rev	5'TTTCAGCCAGCAGTTTCCTT 3'			

Forts. Tab. 7: Real-Time PCR Primer

Name	Sequenz	Annealing (°C)	MgCl ₂ (mM)	Primerkonz. (µM)
Bcl2-A1d for	5'TCCACAAGAGCAGATTGCCCTG 3'	60	2.5	0.25
Bcl2-A1d rev	5'GCCAGCCAGATTGGGTTCAAAC			
Bcl2 forw	5'CCTGTGGATGACTGAGTACCTG 3'	60	2.5	0.25
Bcl2 rev	5'AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG			
Bcl-xL forw	5'GCCACCTATCTGAATGACCACC 3'	60	2.5	0.25
Bcl-xL rev	5'AGGAACCAGCGGTTGAAGCGC 3'			
Mcl1 forw	5'AGCTTCATCGAACCATTAGCAGAA	60	2.5	0.25
Mcl1 rev	5'CCTTCTAGGTCCTGTACGTGGA 3'			
Bax forw	5'GCTGGACACTGGACTTCCTC 3'	60	2.5	0.25
Bax rev	5'CTCAGCCCATCTTCTTCCAG 3'			

2.6 Antikörper

Tab. 8: Primärantikörper

Name/ Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Referenz
Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen pAK; anti-human/Maus	Cell Signaling
Akt	Kaninchen pAK; anti-human/Maus	Cell Signaling
B220-Pacific Blue (RA3-6B2)	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
B220-PerCP	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
B220-APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
β7 integrin-biotin	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
c-Met/Hgfr-FITC	Ratte IgG1 mAK; anti-Maus	eBioscience
c-Myc	Maus mAK; anti-human/Maus	Cell Signaling
Calnexin	Kaninchen pAK; anti-human/Maus	Stressgen
Caspase 3	Kaninchen pAK; anti-Maus	Cell Signaling
Cleaved Caspase 3 (Asp.175)	Kaninchen pAK; anti-Maus	Cell Signaling
Caspase 9	Kaninchen pAK; anti-Maus	Cell Signaling
Cleaved Caspase 9 (Asp.353)	Kaninchen pAK; anti-Maus	Cell Signaling
CCL21	Ziege IgG pAK; anti-Maus	R&D
CCR7-PE (4B12)	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CXCL12-biotin	Ziege pAK; anti-Maus	R&D

Forts. Tab.8: Primärantikörper

Name/ Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Referenz
CXCR4-PE (447717)	Maus IgG2b mAK; anti-human	R&D
CXCR4-PE (2B11)	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CXCR4-AF 647 (2B11)	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	eBioscience
CXCR4-biotin (2B11)	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CXCR5-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD-Biosciences
CXCR7-PE (358426)	Maus IgG2a mAK; anti-human	R&D
CXCR7-APC (11G8)	Maus IgG1 mAK; anti-human	R&D
CXCR7 (11G8)	Maus IgG1 mAK; anti-human	R&D
CXCR7	Schaf pAK; anti-Maus	R&D
CXCR7 biotin (8F11-	Maus IgG2b mAK; anti-human/Maus	Biologend
CD3-Pacific Blue	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD3-FITC	Maus IgG2a mAK; anti-human	BD Biosciences
CD3-PE	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD3-PerCP	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD3-APC	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD4-Pacific Blue	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD4-FITC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD4-PerCP	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD8-Pacific Blue	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD8-PerCP	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD8-AF 488 (4B11)	Mouse IgG2b mAK; anti-human	Serotec
CD11b-Pacific Blue	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD11b-PE	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD11b-biotin	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	eBioscience
CD11c-biotin	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
CD11c-AF 488	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
CD14-FITC	Maus IgG1 mAK; anti-human	Biologend
CD16/32	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CD18-FITC	Maus IgG1 mAK; anti-Maus	Caltag
CD19-PE	Maus IgG2a mAK; anti-human	Biologend
CD21-APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD23-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD25-PerCP	Ratte IgG1 mAK; anti-Maus	Biologend
CD29-biotin	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biologend
CD43-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biologend
CD44-PE	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend
CD45 Pacific Blue	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biologend

Forts. Tab.8: Primärantikörper

Name/ Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Referenz
CD45 FITC	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD45.1-FITC	Maus IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CD45.1-AF 700	Maus IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD45.2 Pacific Blue	Maus (SJL) IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD45.2 AF 488	Maus (SJL) IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD45.2-biotin	Maus IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CD49d-biotin	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD62L-FITC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CD71-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD106 Pacific Blue	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD117-APC	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD119-biotin	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD121a-biotin	Armenischer Hamster IgG mAK; anti-Maus	Biolegend
CD127-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
CD127-biotin	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
CD210-PE	Ratte IgG1 mAK; anti-Maus	Biolegend
EEA1	Maus IgG1 mAK; anti-human	BD Biosciences
F4/80-APC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	eBioscience
Gapdh	Kaninchen pAK; anti-Maus/human	Abcam
GM130	Maus IgG1 mAK; anti-human	BD Biosciences
gp38-AF 488	Syrischer Goldhamster IgG mAK; anti-Maus	eBioscience
gp38-biotin	Syrischer Goldhamster IgG mAK; anti-Maus	eBioscience
Gr-1-APC	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
Gr-1-biotin	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	Biolegend
I-A ^b	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
IgD-FITC	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
IgD-biotin	Ratte mAK; anti-Maus	R&D
Igf-IR-PE	Huhn mAK; anti-Maus	Abcam
IgM-PE	Ratte mAK; anti-Maus	BD Biosciences
IgM-biotin	Ratte mAK; anti-Maus	BD Biosciences
Ihh	Kaninchen mAK; anti-Maus	Abcam
LFA-1	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	BD Biosciences
LtβR-biotin	Ziege IgG mAK; anti-Maus	R&D
Sca1-PE	Ratte IgG2a mAK; anti-Maus	Biolegend
α-SMA	Kaninchen mAK; anti-Maus	Abcam
Ter119-biotin	Ratte IgG2b mAK; anti-Maus	BD Biosciences

Tab. 9: Sekundärantikörper und Streptavidin-Konjugate

Name	Isotyp/Spezifität	Referenz
Anti-Schaf F(ab') ₂ -HRP	Kaninchen anti Schaf F(ab') ₂ , Peroxidase	Southern Biotech
Anti-Kaninchen-HRP	konjugiert Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Peroxidase	Southern Biotech
Anti-Kaninchen AF 568	konjugiert Ziege anti Kaninchen IgG	Molecular Probes, Invitrogen
Anti-Maus-HRP	Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Southern Biotech
Anti-Maus AF 488	Ziege anti Maus IgG	Molecular Probes
Anti-Maus AF 568	Ziege anti Maus IgG	Molecular Probes
Anti-Ratte-PE	Ziege anti Ratte IgG	BD Biosciences
Anti-Ratte AF 568	Ziege anti Ratte IgG	Molecular Probes
Anti-Ratte AF 488	Ziege anti Ratte IgG	Molecular Probes
Anti-Maus-APC	Ziege anti Maus IgG	Biolegend
anti-Huhn-Cy5	Esel anti Huhn IgY	Jackson Immuno Research
anti-Ziege AF 568	Esel anti Ziege IgG	Jackson Immuno Research
anti-Ziege AP	Esel anti Ziege IgG	Jackson Immuno Research
anti-Hamster AF 568	Ziege anti Hamster IgG	Molecular Probes
Streptavidin-FITC		Biolegend
Streptavidin-PE		BD Biosciences
Streptavidin-PerCP		BD Biosciences
Streptavidin-APC		Biolegend
Streptavidin-AF 568		Molecular Probes, Invitrogen

2.7 Puffer und Medien

In diesem Abschnitt nicht aufgeführte Puffer und Medien sind in den jeweiligen Methoden angegeben.

Puffer

<u>DNA-Probenpuffer (10x)</u>	0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylene-Cyanol, 30 % Glycerin
<u>HSL-Lysepuffer (1x)</u>	20 mM Hepes pH 7.9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1% NP-40 (frisch hinzu: 1 mM PMSF, 5 µg/ml Aprotinin, 10 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 2 mM β-Glycerolphosphat)
<u>Lämmli-Laufpuffer (10x)</u>	250 mM Tris, 2.5 M Glycin, 1 % SDS
<u>LB-Medium (Agar)</u>	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H ₂ O (15 g Agar)

Material

<u>PBS(T)</u>	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , ad 1l H ₂ O, pH 7.2 (0.05 % Tween-20)
<u>Protein-Probenpuffer (2x)</u>	125 mM Tris pH 6.8, 4 % SDS, 0.002 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol
<u>RIPA-Lysepuffer</u>	50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 0.25 % Na-Deoxycholat (frisch dazu: 1mM PMSF, 5 µg/ ml Aprotinin)
<u>„Stripping“-Puffer</u>	0.1 M Glycin, 0.15 M NaCl, ad 1l H ₂ O pH 2.5
<u>TAE (50x)</u>	2 M Tris, 5.71% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA pH 8.0
<u>TBS(T)</u>	50 mM Tris/ HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, ad 1l H ₂ O (0.1% Tween-20)
<u>TE</u>	10 mM Tris/ HCl, 1 mM EDTA, ad 1l H ₂ O, pH 7.4
<u>Western-Blot Transferpuffer</u>	20% Methanol, 250 mM Tris, 2.5 M Glycin

Zellkulturmedien

<u>DMEM</u>	500 ml DMEM (PAA, Cölbe), 50 ml FCS (Lonza), 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ml; PAA), 5 ml 200 mM Glutamin (PAA), 5 ml 100 mM Natriumpyruvat (Gibco/BRL) OP9-DL1 Zellen: 100 ml FCS, 5 ml 100x nicht-essenzielle-Aminosäuren (Gibco/ BRL), 500 µl 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/ BRL)
<u>RPMI</u>	500 ml RPMI (PAA, Cölbe), 50 ml FCS (Lonza), 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml; PAA), 5 ml 200 mM Glutamin (PAA), 500 µl 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/ BRL) für primäre Maus-lymphozyten
<u>IMDM</u>	500 ml IMDM (Gibco/BRL), 25 ml FCS (Lonza) (SCB.29 Zellen) bzw. 100 ml FCS (primäre murine Knochenmarkzellen), 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml; PAA)
<u>Eµ-Myc-Medium</u>	250 ml RPMI (PAA, Cölbe), 250 ml IMDM (Gibco/BRL), 50 ml FCS

(Lonza), 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml; PAA), 5 ml 200 mM Glutamin (PAA), 250 µl 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/BRL)

Fibroblastenmedium 500 ml DMEM mit Glutamax-I (Gibco/BRL), 60 ml FCS (Sigma), 5.7 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL), 5.7 ml Penicillin/ Streptomycin (Gibco/BRL), 1.2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol

ES-Zellkulturmedium 500 ml DMEM mit Glutamax-I (Gibco/BRL), 90 ml FCS (Sigma), 6 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL), 6 ml Penicillin/ Streptomycin (Gibco/BRL), 1.2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol, 60µl LIF*

* Zellkulturüberstand LIF produzierender Zellen (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Carmen Birchmeier, MDC-Berlin).

Trypsin-Lösung 0.05% Trypsin, 0.02% EDTA (PAA) in PBS

Einfriermedium 90% FCS, 10% DMSO

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium (Agar): 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H₂O (15 g Agar)

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden Bakterien des *E.coli* Stammes XL-1-Blue oder DH5 α in LB-Medium angeimpft oder auf LB-Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Bakterienklone wurden selektioniert durch Zugabe von 100 μ g/ ml Ampicillin oder 30 μ g/ ml Kanamycin (Roth, Karlsruhe). Zur längeren Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen bestehend aus 700 μ l Bakterienkultur und 300 μ l 50 % Glycerin angelegt und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Herstellung chemisch bzw. elektrokompetenter *E.coli*

TFB1-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH 5.8

TFB2-Puffer: 10 mM Pipes, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 6.5

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* wurden 500 ml LB-Medium mit logarithmisch wachsenden Bakterien angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.6 wachsen gelassen. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 4000 Upm, 4°C). Das Zellpellet wurde einmal mit 5 ml kaltem sterilen PBS gewaschen und in 50 ml TFB1 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 8 ml TFB2 resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert (je 50 μ l), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80°C aufbewahrt.

Für die Herstellung elektrokompetenter *E.coli* wurden 125 ml einer logarithmisch wachsenden *E.coli*-Kultur (OD₆₀₀ = 0.5-0.6) für 15 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (15 min, 4000 Upm, 4°C). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 25 ml kaltem H₂O und einmal mit 5 ml kaltem 10 % Glycerin gewaschen und in 0.5 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Bakterien wurden entweder direkt für die Elektroporation weiterverwendet oder aliquotiert (je 50 μ l) in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Lagerung bei -80°C).

3.1.3 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Zur Transformation nach dem Hitzeschock-Verfahren wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien mit der zu transformierenden DNA (0.1-1 µg Plasmid-DNA oder 10-20 µl Ligationansatz) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42°C, wonach die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt wurden. Nach Zugabe von 700µl LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C geschüttelt (900 Upm) und anschließend auf LB-Agarplatten mit selektionierendem Antibiotikum ausplattiert.

3.1.4 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Für die Transformation durch Elektroporation wurden 50 µl elektrokompente *E. coli* mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Elektrodenabstand; BioRad, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1.8 kV, 25 µF, 200 Ohm mit Hilfe des „BioRad Gene Pulser“ (BioRad). Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert.

3.1.5 Isolation von DNA

3.1.5.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris, 10 mM EDTA, HCl ad pH 8.0, 100µg/ml RNase A, 4°C
Puffer P2 (Lyse-Puffer):	200 mM NaOH, 1.0 % SDS (w/v), RT
Puffer P3 (Neutralisations-Puffer):	3 M Kaliumacetat, Essigsäure ad pH 5.5, RT
TE-Puffer:	10 mM Tris/ HCl, 0.1 mM EDTA, ad pH 8.0

Zur schnellen qualitativen Analyse von gewünschten Plasmiden wurden kleine Mengen an Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus 3 ml *E. coli*-Übernachtskulturen isoliert. 1.5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert (30 s, 13000 Upm, RT), das Zellpellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 300 µl P2-Puffer versetzt und für 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 300 µl P3-Puffer wurde die Reaktion neutralisiert und anschließend abzentrifugiert (20 min, 13000 Upm, 4°C). Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 0.7 Vol. Isopropanol 5 min auf Eis gefällt, 20 min abzentrifugiert und zweimal mit 70 % Ethanol

gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Präparative Plasmidisolierungen erfolgten nach dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie mit Hilfe des „JETSTAR Plasmid-Maxi-Kit“ (Genomed, Bad Oeyenhausen) nach Angaben des Herstellers. DNA aus BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Klonen wurde mit Hilfe des „QIAGEN® Large-Construct Kit“ (Qiagen, Hilde) isoliert.

3.1.5.2 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen

ES-Lysepuffer: 10 mM Tris/ HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5 % N-Lauroylsarcosin, 200 µg/ ml Proteinase K

Zur Isolation von genomischer DNA aus ES-Zellen wurden die auf gelatinisierten 96-Loch-Platten gewachsenen Zellen (s.a. Kap. 3.4.3) einmal mit PBS gewaschen und mit 50 µl ES-Lysepuffer/ Loch ü.N. bei 60°C in einer Feuchtkammer lysiert. Es erfolgte eine DNA-Fällung für 30 min bei RT durch Zugabe von eiskaltem 100%-igen Ethanol mit 1/67 Vol. 5 M NaCl (100 µl/ Loch). Anschließend wurde die DNA viermal mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und bei 4°C gelagert.

3.1.5.3 Isolation genomischer DNA aus Geweben

Gewebe-Lysepuffer: 100 mM Tris/ HCl pH 8.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 400 µg/ ml Proteinase K

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde 0.5-1.0 cm Schwanzspitze in 250-500 µl Gewebe-Lysepuffer ü.N. bei 55°C inkubiert. Die DNA im Überstand wurde nach Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, RT) durch Zugabe von 250-500 µl Isopropanol gefällt und einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 200 µl TE-Puffer gelöst, durch Zugabe von 100 % Ethanol/ 1/10 Vol. 5M NaCl erneut gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet, in 100 µl TE-Puffer für 2h bei 55°C gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

3.1.6 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheitsgrad von Nukleinsäuremolekülen wurden UV-spektrometrisch mit Hilfe eines „NanoDrop“ Messgerätes (Thermo Scientific, USA) ermittelt.

3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifizierung gewünschter DNA-Abschnitte und für gezielte Mutagenesen (Einführung bestimmter Schnittstellen oder Mutationen) wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. In der Arbeit wurde bevorzugt die Pfu-DNA-Polymerase (Roboklon, Berlin) aufgrund ihrer intrinsischen „5'→3'-Proofreading“-Aktivität verwendet, ansonsten die Taq-DNA-Polymerase (Roboklon). Die PCR-Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

3.1.8 Isolierung von RNA und Reverse Transkription

RNA aus Säugerzellen wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und auf korrekte Integrität mit dem „2100 Bioanalyzer System“ (Agilent) hin überprüft. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „SuperScript®III First-Strand Synthesis System“ (Invitrogen), bzw. für geringe RNA-Mengen, mit dem „SuperScript®VILO™ cDNA Synthesis Kit“ (Invitrogen). Für Gen-Arrays wurde eine Gesamtmenge von 700 ng RNA mit Hilfe des „RT² First Strand Kit“ (SA Biosciences) revers transkribiert.

3.1.9 Quantitative Real-time PCR-Analyse

Sequenz-spezifische Primer wurden mit Hilfe der „Primer3 Input Software 0.4.0“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen (Tab. 7). Ein typischer RT-PCR Ansatz bestand aus 100-200 ng cDNA, 1x SYBR Green, 1x Puffer A (Roboklon, Berlin), 0.2 mM dNTPs, 0.25 µg BSA, 0.009 U „Perpetual Taq DNA Polymerase“ (Roboklon), 0.2-0.5 µM 5' und 3' Primer, 2-4 mM MgCl₂ und H₂O ad 25 µl. Die Real-Time PCR wurde durchgeführt mit Hilfe des „StepOnePlus Real Time PCR System“ (Applied Biosystems) unter der Verwendung des folgenden Programmes: 1x 10 min 95°C, 40x (10 s 95°C, 30 s Annealing, 20 s 72°C), 1x 1 min 95°C, 1x 1 min 55 °C, Erhöhung in 0.3°C Schritten auf 95°C. Die Genexpression wurde relativ zu der in demselben Experiment bestimmten GAPDH Expression mit der „StepOne Software 2.0“ (Applied Biosystems) ausgewertet.

Für Genarray-Analysen wurden die Gen-Arrays „Mouse Cancer Pathway Finder“, „Signal Transduction Pathway Finder“ und „Inflammatory Response and Autoimmunity Array“ (SA

Biosciences) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Diese ermöglichen jeweils die gleichzeitige Analyse von 84 Genexpressionen. Die Analysen wurden an einem „iQ5 Real-Time PCR Detection System“ (BioRad) durchgeführt und mit der „iQTM5 Optical System Software“ (BioRad) ausgewertet. Hierbei wurde die $\Delta\Delta C_t$ basierte x-fache Veränderung der Genexpression eines Zielgens kalkuliert, welche zu den Expressionen der Referenzgene *β -Actin*, *GAPDH*, *Hsp90*, *Hprt1* und *Gusb* normalisiert wurde.

3.1.10 Restriktionsverdau von DNA und Dephosphorylierung

Für die sequenzspezifische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Für 1 μ g Plasmid-DNA wurden 1-5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Der Verdau erfolgte mindestens für 3 h oder über Nacht. Für den Restriktionsverdau von genomischer DNA aus ES-Zellen wurden zusätzlich 100 μ g/ ml BSA, 50 μ g/ ml RNase (Roche) und 1 mM Spermidin dem Restriktionsansatz zugesetzt. Linearisierte Vektoren wurden in der Regel nach dem Verdau mit der alkalischen Phosphatase SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) an den 5'-Enden dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern und dadurch die Effizienz anschließender Ligationen zu erhöhen. Für die Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz für 30 min bei 37°C mit 1 U/ 5 μ g DNA SAP inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 15 min Inkubation bei 75°C inaktiviert. Die Isolation und Aufreinigung der gespaltenen DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.1.11 und 3.1.12).

3.1.11 Standard-Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (50x): 2 M Tris, 5.71 % (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA pH 8.0

DNA-Probenpuffer (10x): 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylene-Cyanol, 30 % Glycerin

Für die größenabhängige Auftrennung von DNA-Molekülen wurden 0.8-2.5 % Agarose-Gele (0.8-2.5 g Agarose/ 100 ml 1x TAE, 0.5 μ g/ ml Ethidiumbromid) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol. 10x DNA-Probenpuffer versetzt und bei 4-8 V/ cm Laufstrecke in 1x TAE-Puffer in horizontalen Gelkammern elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Anregung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid mit Hilfe von UV-Licht

(254-366 nm) konnten die DNA-Fragmente anschließend analysiert werden. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde eine 1 kB-Leiter von Gibco/BRL (Eggenstein) aufgetragen.

3.1.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der größenabhängigen Auftrennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurden gewünschte DNA-Fragmente unter UV-Licht rasch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel extrahiert mit Hilfe des „QIAquickTM Gel-Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden).

3.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines zu klonierenden DNA-Fragments mit vektorieller DNA wurde ein 20 µl Ligationsansatz hergestellt (1 U T4 DNA-Ligase, 2 µl 10x Ligasepuffer; Roche, Mannheim) und über Nacht bei 16°C inkubiert. Das molare Verhältnis Vektor : Klonierungsfragment betrug dabei 1:2, 1:3 oder 1:4, wobei die Vektormenge stets 50 ng umfasste.

3.1.14 DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxymethode von Sanger et. al. (Sanger, et.al., 1977) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden von der Firma Invitek (Berlin-Buch) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Blast-N-Programmes (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast).

3.1.15 Southern-Hybridisierung (Southernblot-Analyse)

3.1.15.1 Transfer von DNA auf Membranen

Denaturierungspuffer:	0.5 M NaOH, 1 M NaCl
Neutralisationspuffer:	0.5 M Tris/ HCl pH 7.4, 3 M NaCl
SSC-Puffer (20x):	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat

Die mit Restriktionsendonukleasen verdaute genomische DNA aus ES-Zellen oder Mausschwänzen wurde in Agarosegelen zunächst größenabhängig elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 15 min mit 0.25 M HCl depuriniert, für 30 min in Denaturie-

rungspuffer denaturiert und 30 min in Neutralisationspuffer neutralisiert. Der Transfer erfolgte ü.N. in einem Sandwich bestehend aus drei Lagen Whatman-Papier (Schleicher&Schuell, Dassel) mit Kontakt zu einem 10x SSC-Reservoir, dem Gel, der Nylonmembran (Zeta-Probe®GT Blotting Membran, BioRad), zwei Whatman-Papieren und einem mit einem Gewicht beschwerten Stapel Saugpapier. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und die DNA mit UV-Licht (150 mJoule/ cm²) fixiert.

3.1.15.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Mit Hilfe des „Prime-It®II Random Primer Labeling Kit“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurden 25 ng DNA-Sonde mit 50 µCi [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol; NEN, Köln) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die Trennung der markierten Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden erfolgte mit „MicroSpin™ G-50 Columns“ (Amersham, Freiburg).

3.1.15.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung der radioaktiv markierten DNA-Sonde mit der fixierten genomischen DNA auf der Nylonmembran erfolgte mit Hilfe der „QuikHyb® Hybridization Solution“ (Stratagene) ü.N. in einem Rollerofen. Die Membran wurde zunächst bei 68°C für 10 min mit der Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde, die zuvor mit 1.5 mg Lachsspemien-DNA (Stratagene) für 5 min aufgekocht wurde, wurde anschließend zu der Hybridisierungslösung hinzugegeben und ü.N. bei 68°C mit der Membran unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal mit 2x SSC/ 0.1 % SDS (20 min, RT), einmal mit 0.5x SSC/ 0.1 % SDS (20 min, RT) und zweimal mit 0.2x SSC/ 0.1 % SDS (30 min, 65°C) gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Schließlich wurden die radioaktiv-markierten DNA-Fragmente durch Exposition von Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR) bei -80°C und anschließender fotografischer Entwicklung sichtbar gemacht.

3.1.16 Klonierungen

Alle in dieser Arbeit generierten Expressionsplasmide wurden durch Sequenzierung und, sofern ein entsprechender Promotor vorlag, nach Transfektion bzw. Transduktion durch FACS-Analyse verifiziert.

3.1.16.1 Klonierung der humanen CXCR7 Expressionskonstrukte

Für die Generierung eines eukaryotischen sowie retroviralen Expressionsplasmids für das humane *CXCR7*-Gen wurde die hCXCR7 cDNA mittels einer Standard-PCR unter Verwendung der Schnittstellen Bgl II (5') und EcoRI (3') amplifiziert. Als Templat diente das Plasmid pCMV6-XL5-hCXCR7. Das erhaltene PCR-Produkt wurde zunächst in den Klonierungsvektor pSP72 subkloniert, um die Sequenz der cDNA durch Sequenzierung verifizieren zu können. Anschließend wurde das Gen in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-EGFP und in den retroviralen Vektor pMSCV2.2-IRES-EGFP unter Verwendung der gleichen Schnittstellen umkloniert.

3.1.16.2 Klonierung des konditionellen CXCR7 Targeting Konstrukts

Für die Generierung des induzierbaren Rekombinationsvektors zur konditionellen Geninaktivierung des murinen *CXCR7*-Gens wurde ein ~ 12.5 kB großes genomisches DNA Fragment ausgehend vom BAC-Klon RP24-112C5 in den Vektor pBluescript-II-SK(+)-DTA (pDTA) durch homologe Rekombination umkloniert. Das 12.5 kB Fragment enthielt das ~ 2.5 kB große Exon 2 des *CXCR7*-Gens, welches den kompletten ORF enthält. Der Vektor pDTA enthielt neben einem Ampicillin-Resistenzgen zusätzlich ein *DTA*-Gen (Diphtherietoxin A), welches später ES-Zellklone, in denen keine spezifische (homologe) Rekombination stattgefunden hat, negativ selektionieren sollte. In ES-Zellklonen mit homologer Rekombination hingegen wird das *DTA*-Gen während des Rekombinationsprozesses deletiert und führt zum Überleben der Zellen. Für die Klonierung des 12.5 kB BAC-Fragments in den Vektor pDTA wurden zunächst zwei 400 bp Fragmente 2.7 bp stromaufwärts (Fragment A-B mit den Schnittstellen 5'-XhoI-Sal und 3'-HindIII) und 5.6 bp stromabwärts (Fragment C-D mit den Schnittstellen 5'-Hind III und 3'-Spe I) aus dem BAC-Klon RP24-112C5 mittels PCR amplifiziert und nach-

einander in die MCS des pDTA-Vektors kloniert. Das resultierende pDTA-ABCD Konstrukt wurde in rekombinationskompetente EL350 Zellen (Liu *et al.*, 2003) elektroporiert, welche zuvor mit dem BAC-Klon RP24-112C5 (Chloramphenicolresistenz) transfiziert worden waren. Die homologe Rekombination des 12.5 kB BAC-Fragments in den Vektor pDTA-ABCD wurde anschließend durch Aktivierung der Rekombinationsgene *exo*, *bet* und *gam* des Phagen λ bei 42°C induziert (Court *et al.*, 2003).

Im nächsten Schritt wurde ein Neomycinresistenzgen, welches von zwei FRT-Sequenzen (Erkennungssequenz für Flip-Rekombinasen) und zwei loxP-Sequenzen (Erkennungssequenz für Cre-Rekombinasen) flankiert ist, stromaufwärts des Exon 2 eingeführt. Hierfür wurden zwei benachbarte 400 bp Homologiearme stromaufwärts des Exon 2 (Fragment I-J mit den Schnittstellen 5'XhoI und 3'EcoRV-HindIII; Fragment K-L mit 5'NotI und 3'XhoI-NotI) in die beiden MCSs des Vektors pHW025 kloniert. Durch Elektroporation des resultierenden pHW025-IJ-KL Konstrukts in EL350 Zellen mit dem pDTA-ABDC-Konstrukt und 42°C Induktion der Rekombination wurde die Neomycinkassette stromaufwärts eingebaut. Infolge einer Arabinose-induzierten Expression eines Cre-Rekombinase-Gens wurde anschließend das Neomycin-Gen und die FRT-Sequenzen wieder deletiert, wobei beide loxP-Sequenzen zu einer loxP-Sequenz 5' des Exon 2 fusioniert wurden.

In einem zweiten Schritt wurde ein Neomycinresistenzgen, welches von zwei FRT-Sequenzen und einer loxP-Sequenz (3') flankiert ist, stromabwärts des Exon 2 eingeführt. Dazu wurden zwei 400 bp Homologiearme stromabwärts des Exon 2 (Fragment E-F mit 5' XhoI und 3' HindIII-EcoRI; Fragment G-H mit 5' SacII und 3'XhoI-SacII) aus dem BAC-Klon in den Vektor pHW025 kloniert und die Neomycinkassette durch Rekombination stromabwärts des Exon 2 integriert.

Zusammen mit den beiden loxP-Sequenzen wurden mittels der Primer J und F eine EcoRV und eine HindIII-Schnittstelle 5'(EcoRV) und 3'(HindIII) des Exon 2 in das Konstrukt eingeführt, welche später für das Screening der ES-Zellklone auf homologe Rekombination mittels Southern-Blot-Analyse verwendet werden konnten.

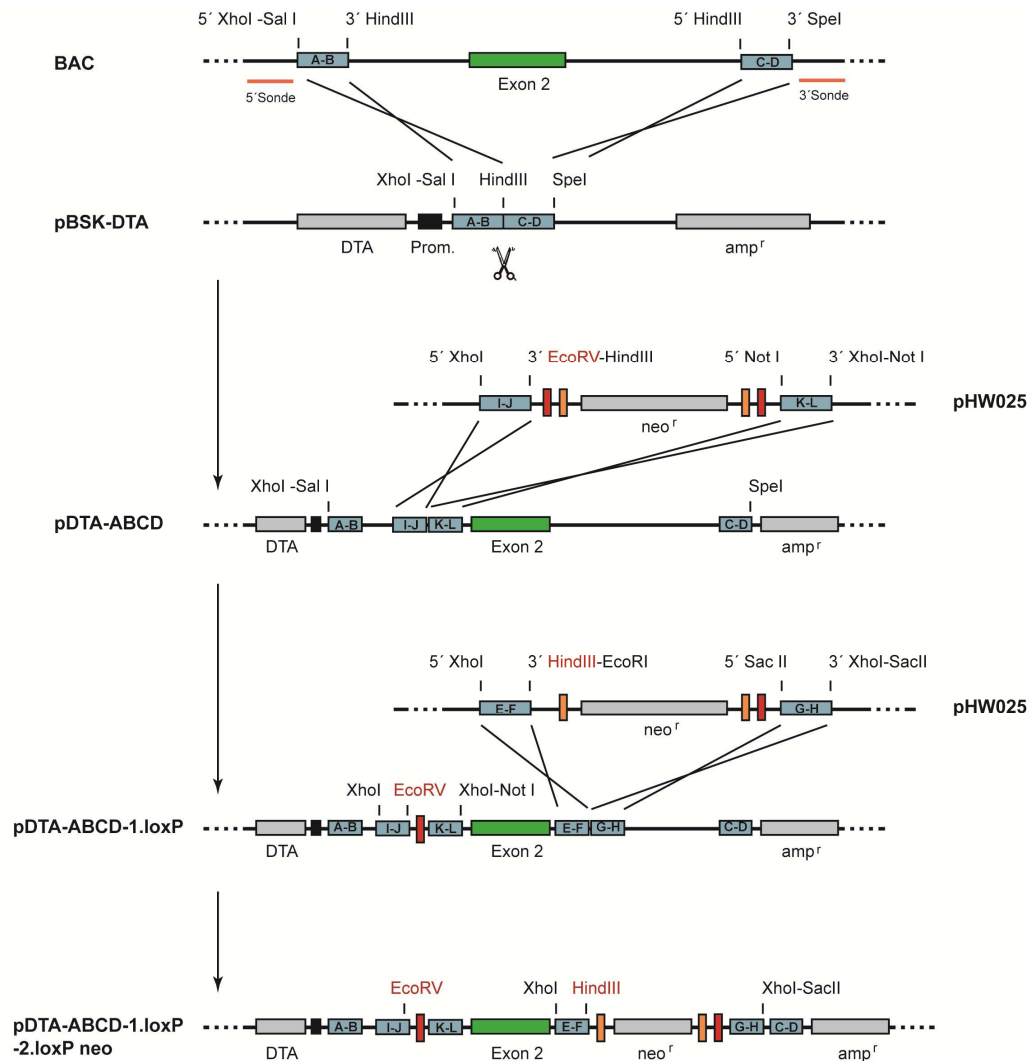


Abb. 9: Klonierung des konditionellen CXCR7 Targeting-Konstrukts Schematische Darstellung der Struktur des CXCR7-Wt-Lokus und der einzelnen Klonierungsschritte zur Generierung des konditionellen Rekombinationsvektors. Die Exons sind als graue Boxen (Ausnahme CXCR7 Exon 2 grün), die Introns durch schwarze Linien und die verwendeten Homologiearme als blaugraue Boxen dargestellt. Gestrichelte Linien repräsentieren Sequenzbereiche der Klonierungsvektoren. Die loxP-Sequenzen sind durch rote Boxen symbolisiert, die FRT-Sequenzen durch orange Boxen. neo^r, Neomycinresistenzgen; amp^r, Ampicillinresistenzgen; DTA, Diphtherietoxin A; pBSK, pBluescript II SK; Prom., HSV TK Promotor.

3.1.16.3 Klonierung der 5´ und 3´-Sonde für die Southernblot-Analyse

Um ES-Zellklone, in denen eine homologe Rekombination des Rekombinationsvektors für die konditionelle Inaktivierung des CXCR7-Gens stattgefunden hat, identifizieren zu können, wurden eine ~700 bp große 5´-Sonde und 700 bp große 3´-Sonde generiert. Diese binden genomische Sequenzen 2717 bp stromaufwärts (5´) des CXCR7-Exon 2 (5´-Sonde) bzw. 5645 bp stromabwärts des CXCR7-Exon 2 (3´-Sonde) (s. Abb. 9). Mit Hilfe einer Standard-

PCR wurden unter Verwendung der Schnittstellen HindIII (5') und EcoRI (3') sowie der genomischen Sequenz des BAC-Klons RP24-C112C5 als Templat die 700 bp Sondensequenzen erhalten und in den Vektor pcDNA-3.1(-) kloniert. Die Sonden wurden anschließend für Southernblot-Analysen durch Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

RIPA-Lyse-Puffer:	50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 0.25 % Natriumdesoxycholat, 1 mM PMSF, 5 µg/ ml Aprotinin
HSL-Lyse-Puffer:	20 mM Hepes pH 7.9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 % NP-40, 1 mM PMSF, 5 µg/ ml Aprotinin, 10 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 2 mM β-Mercaptoethanol
Bradford-Reagenz:	Coomassie®Brillant Blue G-250 (BioRad, München); 1:5 mit H ₂ O verdünnt

Zur Präparation von Proteinlysaten wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und mittels einer Neubauer-Zählkammer (nach Mishell 1980) gezählt. Das Zellpellet wurde in eiskaltem RIPA-Lyse-Puffer in einer Endkonzentration von 1×10^7 Zellen / 100 µl Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C rotiert. Sollten zusätzlich Kernextrakte gewonnen werden, wurde das Pellet statt in RIPA-Puffer in eiskaltem HSL-Lyse-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Lysate für 10 min bei 13000 Upm, 4°C zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu pelletieren. Der Protein-haltige Überstand wurde bei -20 bis -80°C gelagert. Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford mit Hilfe des „BIO-RAD Protein Assay“ (BioRad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. BSA (*bovine serum albumin*) diente als Proteinstandard zur Erstellung einer Kalibrierungskurve.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(modifiziert nach Laemmli 1970)

10x Laemmli-Laufpuffer:	250 mM Tris, 2.5 M Glycin, 1 % SDS
2x SDS-Probenpuffer:	125 mM Tris pH 6.8, 4 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol

Die Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe der von Laemmli beschriebenen Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteinproben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Gleiche Mengen an Protein wurden auf ein Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 8 %, 10 % oder 12.5 % Trenngel (TG). Ein 4.5 % iges Sammelgel (SG) diente der Fokussierung der Proben. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern (Owl, Portsmouth NH, USA) in 1x Laemmli-Laufpuffer bei 5-8 V/ cm.

Tab. 10: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen

	12.5% TG	10% TG	8% TG	4.5% SG
H ₂ O	16.75 ml	19.80 ml	23.20 ml	7.5 ml
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid; Roth)	20.75 ml	16.7 ml	13.30 ml	1.875 ml
1.5 M Tris/ HCl pH 8.8, 0.4% SDS	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	
0.5 M Tris/ HCl pH 6.8, 0.4% SDS				3.125 ml
10% APS	250 µl	250 µl	250 µl	90 µl
TEMED (Roth)	25 µl	25 µl	25 µl	9 µl

3.2.3 Immunoblot (Westernblot-Analyse)

3.2.3.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)

Westernblot-Transferpuffer: 20 % Methanol, 250 mM Tris, 2.5 M Glycin

Proteine, die zunächst in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, wurden anschließend im Naßblotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel) in einer „Trans-Blot®SD“ Westernblotkammer (BioRad, München) gemäß den Angaben des Herstellers bei 400 mA für 2 h in Westernblot-Transferpuffer transferiert.

3.2.3.2 Immunologische Detektion von Proteinen

„Stripping“-Puffer: 0.1 M Glycin, 0.15 M NaCl, ad 1l H₂O pH 2.5

Die Nitrozellulosemembran wurde zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen für 30 min in 1x PBST (bzw. TBST im Fall der Detektion von phosphorylierten Proteinen) mit 5% Milchpulver (MP) blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem in 1x PBST/ 1 % MP verdünnten Primärantikörper für zwei Stunden bei RT bzw. ü.N. bei 4°C. Die Membran wurde viermal für 20 min mit PBST gewaschen und weiter für eine Stunde mit einem in 1x PBST/ 1 % MP verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Nach weiteren vier Waschschritten von je 30 min erfolgte die Detektion der gebildeten Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des „Pierce ECL western blotting substrate“ (Pierce, Rockford, USA). Das dabei entstehende Lumineszenzsignal wurde durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMATTM) detektiert. Um die Membran für weitere Analysen verwenden zu können, wurde die Membran für 30 min in „Stripping“-Puffer zur Entfernung gebundener Antikörper geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O konnte die Membran erneut verwendet werden.

3.2.3.3 Quantifizierung von Protein-Banden

Die densitometrische Auswertung von Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes „TINA 2.0“ (Raytest). Die erhaltenen Intensitätswerte wurden um die Hintergrundintensität korrigiert.

3.2.4 Zytokin-Antikörper Array

CD11c⁺IA^{b+} dendritische Zellen aus Mausmilzen (3.3.5.4) wurden zunächst über eine MACS- und FACS-Sortierung aufgereinigt und anschließend lysiert. Die Lyse und Aufarbeitung der Zellen für den „Mouse Cytokine Antibody Array 3“ (Raybiotech) erfolgte exakt nach den Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden je 180 µg Protein.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen (s.a. Kap. 2.7)

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. HEK293A, PlatE und NIH3T3-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS (inaktiviert für 20 min bei 56°C) kultiviert. Jurkat, MOLT14, ALL-SIL, SupT1, LOUCY, RPMI-8402, KM-H2, L591, L1236, L428 und primäre gp38-Zellen aus der Maus erhielten RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und SCB.29 Zellen IMDM-Medium mit 5 % FCS. PlatE-Zellen wurde zusätzlich 10 µg/ ml Blasticidin und 1 µg/ ml Puromycin zum Medium zugefügt, SCB.29 Zellen 1 mg/ ml G-418. Embryonale Fibroblasten und Stammzellen, Eµ-Myc-Lymphomzellen sowie OP9-DL1 Stromazellen erhielten spezielle Medien (Kap. 2.7). Aus Mausgeweben isolierte Primärzellen (Lymphozyten) wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert, Knochenmarkvorläuferzellen in IMDM/ 20 % FCS. Vor Erreichen der Konfluenz wurden adhärent wachsende Zellen 1:3 bis 1:10 passagiert. Hierfür wurden adhärente Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung vom Boden gelöst und in frisches Medium aufgenommen. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen in einer Konzentration von ca. 5×10^6 Zellen/ ml Einfriermedium bei -80°C kryokonserviert und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.2 Transfektion von Säugetierzellen

Zur transienten Expression von Fremdgenen wurden SCB.29 Zellen mittels Elektroporation transfiziert. 6×10^6 Zellen wurden mit 30 µg Plasmid-DNA in 600 µl OptiMEM Medium (Gibco/BRL) gemischt und in einer Elektroporationsküvette (0.4 cm Elektrodenabstand; BioRad) bei 230 V, 960 µF in einem „BioRad gene pulser XcellTM“ (BioRad) elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in IMDM-Medium mit 10 % FCS überführt. HEK293A Zellen wurden transient mit „Lipofectamin 2000“ (Invitrogen, Karlsruhe) mit einem DNA-Lipid Verhältnis (w/v) von 1:3 in OptiMEM transfiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte 24-48 h nach der Transfektion.

3.3.3 Transfektion von siRNA in Säugetierzellen

HEK293A Zellen wurden mit 300 pmol siRNA gegen humanes CXCR7 (SI02660644, Qiagen, Hilden) oder 300 pmol Kontroll-siRNA (sc-31007, Santa Cruz, USA) mit „Oligofectamin“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen retransfiziert und nach weiteren 24 h analysiert.

3.3.4 Generierung stabiler Zelllinien

2×10^6 HEK293A-Zellen wurden mit 15 µg Plasmid-DNA in einer 10 cm Schale transfiziert (Kap. 3.3.2). 24 h später wurden die Zellen auf fünf 24-Loch Zellkulturplatten verteilt und nach 6 h dem Kulturmedium 800 µg/ ml Geneticin-Sulfat (G-418, PAA, Pasching, Österreich) zur Eliminierung nicht transfizierter Zellen zugefügt. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gegen frisches Selektionsmedium ausgetauscht. G-418 resistente Klone wurden schließlich isoliert, expandiert und die Expression des Fremdgenes mittels FACS-Analyse verifiziert.

3.3.5 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Zellen

3.3.5.1 Isolierung von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten, Thymus und Blut

Erythrozyten-Lysepuffer: 1.55 M NH_4Cl , 0.1 M KHCO_3 , 1 mM EDTA, ad pH 7.4

Thymus, Milz und Lymphknoten (inguinal und mesenterial) einer Maus wurden steril präpariert und in PBS mit dem Stempel einer sterilen 5 ml Einmalspritze zerrieben. Die Zellen wurden über einen 70 µm Filter filtriert, abzentrifugiert (1000 Upm, 10 min, 4°C) und einmal mit PBS gewaschen. Splenozyten sowie peripheres Blut wurden zusätzlich zur Depletion von Erythrozyten für 5 min in hypotonischem Erythrozyten-Lysepuffer bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

3.3.5.2 Isolierung und Anreicherung von Knochenmarkvorläuferzellen

Ober- und Unterschenkelknochen einer Maus wurden steril herauspräpariert, mit einem sterilen Skalpell an beiden Enden angeschnitten und der Knochenmarkzylinder mit sterilem RPMI-Medium herausgespült. Die Zellen wurden über einen 100 µm Filter filtriert, abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Zur Anreicherung von Knochenmarkvorläuferzellen wurden Zellen, die die Reifungsmarker CD5, B220, CD11b, Gr-1 und Ter119 exprimierten, mit Hilfe des „Mouse lineage depletion kit“ (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) nach Angaben des Herstellers depletiert. Die verbleibenden Vorläuferzellen wurden in nicht Zellkultur behandelten 6-Loch Platten in IMDM-Medium mit 20 % FCS, 50 ng/ ml SCF, 10 ng/ ml IL-3, 20 ng/ ml IL-6 (PeproTech, Hamburg) und 20 ng/ ml LIF (Novus Biologicals, England) weiterkultiviert (Zellen von 2-3 Mäusen/ Loch).

3.3.5.3 Generierung von dendritischen Zellen (DC) aus Knochenmark

Knochenmarkzellen aus Ober- und Unterschenkelknochen einer Maus wurden wie in Kap. 3.3.5.2 beschrieben isoliert. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 50 µM β-Mercaptoethanol aufgenommen und eine Stunde bei 37°C in einer 10 cm Schale inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen im Überstand (u.a. DC-Vorläufer) wurden abzentrifugiert und in 24 ml Medium mit 20 ng/ ml GM-CSF aufgenommen. Zur weiteren Reifung der DCs wurden den Zellen am Tag sieben 0.2-1 µg/ ml LPS zugesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte am Tag acht.

3.3.5.4 Isolierung von dendritischen Zellen aus der Milz

Zur Isolierung von murinen DCs aus der Milz wurde die Milz mit Collagenase D (2 mg/ ml, Roche) in RPMI-Medium mit 2 % FCS für 30 min bei 37°C verdaut. Dabei wurden die Zellen durch wiederholtes vorsichtiges Pipettieren vereinzelt. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von RPMI-Medium mit EDTA (5 mM Endkonzentration) wurden die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. CD11c positive dendritische Zellen wurden durch eine positive Selektion mit Hilfe von „CD11c Microbeads“ (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) angerei-

chert. CD11c⁺IA^{b+} DC Populationen mit einer Reinheit von über 98 % wurden durch eine anschließende FACS-Sortierung erhalten.

3.3.5.5 Isolierung von gp38⁺-Zellen aus Milz und Lymphknoten

Zur Isolierung von gp38⁺ retikulären fibroblastischen Zellen (FRCs) wurden Milz und Lymphknoten (inguinal und mesenterial) aus einer Maus steril präpariert und für 45 min bei 37°C mit Collagenase D (1 mg/ml, Roche) in RPMI-Medium mit 10 % FCS verdaut. Einzelsuspensionen wurden durch wiederholtes Pipettieren erhalten. Die Zellen wurden für 15 min bei RT, 300 Upm abzentrifugiert, zweimal mit RPMI-Medium mit 10 % FCS gewaschen und in eine 10 cm Schale eingesät. Nach 24 h wurden nicht adhärenente Zellen entfernt und frisches Medium hinzugegeben. Die Kulturen wurden für 3-7 Tage fortgeführt, bis Fibroblasten-ähnliche Zellen sichtbar wurden. Restliche Makrophagen wurden mit Hilfe von „CD11b Microbeads“ (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) depletiert. Adhärenente gp38⁺CD11b⁻ Stromazellpopulationen wurden durch Eliminierung von gp38⁺ Zellen aus FRC angereicherten Stromazellkulturen unter Verwendung von „Biotin Binder Dynabeads“ (Invitrogen) erhalten.

3.3.6 Isolierung und Kultivierung humaner Leukozyten aus peripherem Blut

Peripheres Vollblut von Menschen wurde steril entnommen und von Erythrozyten mittels einer Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung der „Biocoll separating solution“ (Biochrom) depletiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 2000 Upm, RT (ohne Bremse) wurde der Leukozytenring abgenommen, die Zellen zweimal mit RPMI-Medium/ 10 % FCS gewaschen und für 1 h in 10 cm Schalen bei 37°C kultiviert. Die nicht adhärenenten Zellen (alle Leukozyten außer Makrophagen) wurden anschließend direkt für weitere Analysen verwendet oder zur T-Zellaktivierung in CD3/ CD28-Antikörper beschichtete 6-Loch-Platten eingesät und in Anwesenheit von 25 U/ ml humanem IL-2 für zwei Tage weiterkultiviert.

3.3.7 Isolation und Transfer von Eμ-Myc Lymphomzellen

Eμ-Myc transgene Mäuse wurden regelmäßig auf das Auftreten von Krankheitszeichen wie vergrößerte Lymphknoten und Gewichtsverlust von mehr als 15 % hin untersucht. Von er-

kranken Mäusen mit deutlich vergrößerten Lymphknoten konnten Lymphomzellen in relativ großer Reinheit durch Zerreiben der steril entnommenen Lymphknoten in PBS gewonnen und in Empfänger-mäuse transferiert werden. Kongenen Ly5.1 (CD45.1+) oder C57BL/6 Wt (CD45.2+) Empfänger-mäusen wurden in der Regel $1 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ Wt, CCR7^{-/-} oder GFP exprimierende E μ -Myc Lymphomzellen (CD45.2+) *i.v.* injiziert. Insgesamt wurden für den Wt und CCR7^{-/-} Genotyp jeweils mehr als sieben verschiedene Klone verwendet. Der Beginn der Erkrankung war definiert durch tastbare, vergrößerte Lymphknoten und Gewichtsverlust.

Für den Transfer von E μ -Myc Lymphomzellen in DC depletierte Mäuse wurden CD11c.DTR transgene Mäuse (Hochweller *et al.*, 2008) als Empfängertiere verwendet. In CD11c.DTR Mäusen steht die Expression des Diphtherietoxinrezeptors (DTR) unter der Kontrolle des CD11c Promotors. Infolgedessen führt die Verabreichung von Diphtherietoxin (DT) zur spezifischen Deletion von CD11c⁺ dendritischen Zellen. Das DT (Sigma) wurde täglich *i.p.* gespritzt (8 ng/ g Körpergewicht), beginnend am Tag -1 vor der *i.v.* Injektion der Lymphomzellen. Die Effizienz der Deletion wurde mittels FACS-Analyse der Milz und Lymphknoten verifiziert.

3.3.8 Generierung von Retroviren

Transferpuffer: 275 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.8 mM Na₂HPO₄, 1 % Hepes, NaOH ad pH 6.75-6.76

Zur Gewinnung von ecotropen murinen Retroviren wurden Zellen der Verpackungszelllinie PlatE (Morita *et al.*, 2000) in einer Dichte von 8×10^5 Zellen/ Loch einer 6-Loch-Platte eingesät und am folgenden Tag mit 20 μ g retroviraler Plasmid-DNA mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden 20 μ g DNA mit 15 μ l 2.5 M CaCl₂-Lösung (Sigma, Zellkultur getestet) und sterilem H₂O ad 150 μ l vermischt und tropfenweise mit 150 μ l Transferpuffer unter ständigem Mischen versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz erneut kurz durchmischt und das gebildete Präzipitat tropfenweise auf die Zellen gegeben. 48 h nach der Transfektion wurden die Virus-enthaltenden Überstände abgenommen, filtriert (0,45 μ m Filter), aliquotiert (2 ml) und bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung des Retrovirus-Titers wurden NIH3T3-Zellen in eine 24-Loch Platte (4×10^4 Zellen/ Loch) eingesät und 24 h später mit 1:10 verdünntem Virusüberstand und 4 μ g/ ml Polybren versetzt. Die Transduktionseffizienz wurde 48 h später mit Hilfe einer FACS-Analyse der GFP-exprimierenden, infizierten NIH3T3-Zellen bestimmt.

3.3.9 Retrovirale Transduktion von primären murinen Knochenmarkvorläuferzellen und Transplantation

Knochenmarkvorläuferzellen wurden wie in Kap. 3.3.5.2 beschrieben isoliert, angereichert und ü.N. in IMDM-Medium mit 20 % FCS, 50 ng/ ml SCF, 10 ng/ ml IL-3, 20 ng/ ml IL-6 (PeproTech, Hamburg) und 20 ng/ ml LIF (Novus Biologicals, England) in nicht Zellkultur behandelten 6-Loch-Zellkulturplatten ü.N. kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Medium überführt, welches aus mit frischem Medium verdünnten retroviralen Überstand (1:1) bestand und neben den oben genannten Zytokinen 8 µg/ ml Polybren enthielt (ca. 2.5 ml Virusüberstand/ 2×10^6 Zellen). Die Zellen wurden für 90 min bei 2000 Upm, 32 °C auf Retro-nektin (20 µg/ Loch) beschichtete, nicht Zellkultur behandelte 6-Loch Platten zentrifugiert und ü.N. bei 37°C kultiviert. Schließlich wurden die transduzierten Vorläuferzellen eines Spendertieres (CD45.2⁺) zusammen mit 1×10^6 unseparierten Knochenmarkzellen einer Ly5.1 Maus (CD45.1⁺) i.v. in letal bestrahlte (750 Rad) Empfängerermäuse (CD45.2⁺) ko-injiziert. Die Analyse der Mäuse erfolgte 24-27 Tage nach dem Transfer.

Für Chimärismus-Experimente wurden 2×10^5 Knochenmarkvorläuferzellen (CD45.2⁺) zusammen mit 5×10^4 retroviral transduzierten und über FACS-Sortierung aufgereinigten Vorläuferzellen (GFP⁺CD45.2⁺) in subletal bestrahlte (470 Rad) Empfängerermäuse (CD45.1⁺) transplantiert. Der Grad an Chimärismus wurde 14 Tage nach Transfer mittels FACS analysiert.

3.3.10 OP9-DL1 Knochenmarkstromazell-Kokulturen

Knochenmarkvorläuferzellen (Kap. 3.3.5.2) wurden retroviral transduziert (Kap. 3.3.10) und in einer Dichte von $3-5 \times 10^3$ Zellen/ Loch einer 6-Loch-Platte auf eine subkonfluente Schicht von OP9-DL1 Stromazellen eingesät. Die Kokultur erfolgte über zwölf Tage in Anwesenheit von 1 ng/ ml mIL-7 und 5 ng/ ml mFlt3, wobei alle vier bis fünf Tage die Thymozyten passagiert wurden. Zur Passagierung wurden die Zellen abtrysiniert und die Stromazellen von den Thymozyten durch Filtration über einen 70 µm Filter entfernt. Die Thymozyten wurden anschließend auf einer neuen Schicht von Stromazellen in 10 cm Schalen weiterkultiviert. Die Thymozyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur mittels FACS analysiert.

3.3.11 E μ -Myc Lymphomzell-Kokulturen

Für DC-Lymphomzell-Kokulturen wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark generiert (Kap. 3.3.5.8) und in einer Dichte von 1.6×10^6 Zellen / Loch einer 6-Loch Zellkulturplatte eingesät. 5×10^6 frisch isolierte E μ -Myc Lymphomzellen (Kap. 3.3.7) aus den Lymphknoten von erkrankten Tieren wurden in Lymphomzellmedium (Kap. 2.7) hinzugegeben und in Anwesenheit von 500 ng/ ml CCL19/ CCL21 (PeproTech), 0.5 μ g/ml Pertussistoxin (in PBS, Calbiochem) oder 10 μ M bzw. 20 μ M Cyclopamin (in DMSO, Calbiochem) für 20-22 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate mittels FACS-Analyse bestimmt (Kap. 3.3.14).

Für Kokulturen mit gp38⁺ retikulären fibroblastischen Zellen wurden gp38⁺-Zellen wie in Kap. 3.3.5.5 beschrieben isoliert und in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ Loch einer 96-Loch Zellkulturplatte eingesät. 24 h später wurden 2×10^5 frisch isolierte E μ -Myc Lymphomzellen hinzugegeben und nach weiteren 24 h die Apoptoserate bestimmt.

3.3.12 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer: PBS, 0.5 % BSA, 0,05 % NaN₃

Die zu analysierenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, in Rundbodenplatten überführt, abzentrifugiert (1 min, 1500 Upm, 4°C) und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Für den Nachweis intrazellulärer Proteine wurden die Zellen für 20 min bei RT fixiert (*Fixation buffer*, Biolegend, USA), viermal mit Permeabilisierungspuffer (*Permeabilization Wash buffer*, Biolegend) gewaschen und durch Inkubation für 20 min bei 4°C in Permeabilisierungspuffer permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit Antikörperserum der Spezies des Fluorochrom-konjugierten Antikörpers (10 % Ziegerserum, 10 % humanes Serum oder 5 % Mausserum in FACS-Puffer) für 30 min bei 4°C inkubiert. Für primäre Zellen aus der Maus wurden anti-CD16/32 Antikörper zur Blockierung von Fc γ II/III Rezeptoren verwendet. Es erfolgte eine Antikörperfärbung für 30 min bei 4°C in einem Volumen von 100 μ l mit 0.5-1.0 μ g/ml des Antigen-spezifischen Antikörpers (in FACS-Puffer). Nach dreimaligem Waschen wurden im Fall von direkt Fluorochrom-konjugierten Primärantikörpern die Antigene detektiert oder in einem zweiten Färbungsschritt

mit Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern bzw. Streptavidinkonjugaten (im Fall von biotinylierten Primärantikörpern) sichtbar gemacht. Schließlich wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer „FACSCantoII“ (Becton Dickinson) analysiert und die Daten mit dem Computerprogramm „FlowJo“ (TreeStar) ausgewertet. Durchflusszytometer basierte Zellsortierungen von gewünschten Zellpopulationen wurden an einem „FACS Aria“ (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Reinheit der sortierten Zellen betrug in der Regel über 98 %.

3.3.13 Apoptose- und Proliferationsmessungen

Apoptose von Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Hierbei wurden die Zellen mit 7-AAD und Annexin-V-FITC (Bender MedSystems) bzw. Annexin-V-APC (BD Biosciences) in den mitgelieferten Bindungspuffern gemäß den Angaben der Hersteller gefärbt und unmittelbar danach analysiert. Für die Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen wurde das „APC BrdU Flow Kit“ (BD Biosciences) verwendet. Die Messung der Proliferationsrate von SCB.29 *in vitro* erfolgte durch Inkubation der Zellen für zwei Stunden bei 37°C auf CD3 Antikörper beschichteten Zellkulturplatten in Anwesenheit von 20 nM mCXCL12 und 10 µM BrdU. Anschließend wurde die Menge an eingebautem BrdU mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt.

3.3.14 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie

Mowiol-Lösung: 0.2 M Tris/ HCl pH 8.5, 50 % Glycerin, 20 % (w/v) Mowiol 4-88 (Calbiochem)

Primäre gp38⁺ FRCs aus der Maus (Kap. 3.3.5.5) wurden auf Kollagen (Kollagenlösung Typ 1, Sigma) beschichteten Deckgläschen ü.N. kultiviert, primäre humane T-Zellen auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichteten Deckgläschen. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, für 10 min auf Eis mit 3.5 % PFA oder Aceton fixiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Fall der Detektion von intrazellulären Antigenen für 5 min bei RT mit 0.2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 5 % BSA in PBS für 30 min bei RT zur Verhinderung unspezifischer Bindungen blockiert. Es erfolgte eine Inkubation für 1.5 h bei RT mit dem in PBS/ 1 % BSA verdünnten Primärantikörper, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS und einer weiteren Inkubation für 45 min bei RT mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper oder

Streptavidinkonjugat. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit einem Tropfen Mowiolösung überschichtet und durch ein Deckgläschen abgedeckt.

Die Immunfluoreszenzfärbung von SCB.29 Zellen erfolgte in Rundbodenplatten. Die Zellen wurden mit CD16/32 Antikörpern für 20 min bei 4°C blockiert, 30 min bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert und anschließend einmal mit kaltem PBS gewaschen. Es erfolgte eine Stimulation für 10 min mit 20 nM mCXCL12 (PeproTech) bei 37°C, welche durch Zugabe von kaltem PBS/ 0.1 % NaN₃ abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder Streptavidinkonjugaten (in PBS/ 0.1 % NaN₃) gefärbt, zweimal mit PBS/ 0.1% NaN₃ gewaschen, auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (3 min, 1000 Upm) und mit Mowiol eingedeckelt.

Die Analyse der Zellen erfolgte an einem Axiovert 200M inversen „Laserscanning“ LSM510 Meta konfokalen Mikroskop (Zeiss), ausgestattet mit einem Argon und Helium/Neon I oder II Laser und einem 40x oder 63x Phasenkontrast planapochromaten Öl-Immersionsobjektiv. Die Konfigurationen waren wie folgt: GFP $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc}} = \text{BP500-530}$; Alexa Fluor 568 $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc}} = \text{BP565-615}$; Cy5 und Alexa Fluor 647 $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc}} = \text{LP650 nm}$. Alle Aufnahmen wurden mit der „LSM Browser Software“ (Zeiss) ausgewertet. Zur besseren Darstellung von Koloalisationen zwischen Proteinen wurde Alexa Fluor 647 in roten oder grünen Farben dargestellt.

3.3.15 Immunhistologie von Gewebeschnitten

3.3.15.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Für histologische Untersuchungen wurden die entnommenen Organe in Plastikschrälen mit „Tissue Tec OCT“ (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) auf Trockeneis eingebettet und bei -80°C aufbewahrt. Die Kryoschnitte wurden mit einer Dicke von 5 μm an einem Kryostat (Microm HM560) angefertigt, auf silanisierte Objektträger (Roth) überführt, luftgetrocknet, für 10 min mit -20°C Aceton fixiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.15.2 Immunhistologische Färbungen

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Schnitte für 30 min mit 10 % Maus oder Ziegen-serum blockiert. Anschließend wurden die Schnitte für 1h bei RT mit dem Primärantikörper

inkubiert, gefolgt von einer Inkubation für 1.5 h bei RT mit dem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper oder Streptavidinkonjugat. Schließlich wurden die Schnitte mit Mowiol-lösung eingedeckelt.

Fluoreszenz-gefärbte Schnitte wurden mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) analysiert, welches mit einer Axio Cam HRc Kamera (Zeiss) ausgestattet ist. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 40x Plan-Neofluar NA 0.75 oder 20x Planapochromat NA 0.8 Objektiv und wurden mit der „Axio Vision 4.5 Software“ (Zeiss) und Adobe Photoshop ausgewertet. Lichtmikroskopiebilder wurden mit dem gleichen Gerät aufgenommen. Konfokale Mikroskopieaufnahmen wurden mit einem aufrechten Leica TCS SPE konfokalen Mikroskop unter Verwendung eines 40x Phasenkontrast planapochromaten Öl-Objektivs durchgeführt und mit der „Leica LAS AF Software“ (Leica) und Adobe Photoshop ausgewertet.

3.3.16 Caspase-Aktivierungsassay

SCB.29 Zellen wurden mit den Plasmiden pIRES2-EGFP-hCXCR7 oder pEGFP-N3 elektroporiert (Kap. 3.3.2) und am nächsten Tag die GFP-exprimierenden transfizierten Zellen durch FACS-Sortierung aufgereinigt und weiterkultiviert. 24 h später wurden die Zellen auf CD3-Antikörper beschichteten Platten für eine Stunde mit 20 nM mCXCL12 prästimuliert, gefolgt von einer Apoptoseinduktion durch Zugabe von 1 μ M Staurosporine (Cell Signaling). Proteinlysate für die Analyse im Westernblot wurden drei Stunden nach Apoptoseinduktion hergestellt (Kap. 3.2.1).

3.3.17 Aktivierungs-induzierte Phosphorylierung von Signaltransduktionsproteinen

Murine B-Zellen aus der Milz wurden durch negative Selektion mit Hilfe des „B Cell Isolation Kit“ (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) nach Angaben des Herstellers isoliert und für fünf Stunden in serumfreiem RPMI-Medium mit 0.5 % BSA gehungert. Diese B-Zellen sowie frisch isolierte E μ -Myc Lymphomzellen aus Lymphknoten von E μ -Myc transgenen Mäusen (Kap. 3.3.7) wurden in vorgewärmtem Hungermedium resuspendiert (4×10^6 Zellen/ 0.5 ml) und für 0, 5, 10 und 20 min mit 500 ng/ ml mCCL21 oder mCCL19 (PeproTech) bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde abgestoppt durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff.

Die Zellpellets wurden mit 25 µl HSL-Lysepuffer lysiert (Kap. 3.2.1) und im Westernblot analysiert.

3.4 Knockout-Technik bei Mäusen

3.4.1 Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten werden in der Kultur von ES-Zellen als sogenannte *Feeder* verwendet, da sie den Zellen als Matrix für ihr Wachstum dienen und deren Omnipotenz aufrechterhalten. Kryokonservierte Fibroblasten wurden im 37°C warmen Wasserbad rasch aufgetaut, in vorgewärmtes Fibroblasten-Medium (Kap. 2.7) überführt, abzentrifugiert (1000 Upm, 4 min, RT) und in 20 ml Medium auf 15 cm Zellkulturschalen eingesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Fibroblasten 1:3 bis 1:4 passagiert. Vor der Verwendung als *Feeder* wurden die Fibroblasten für zwei Stunden bei 37°C mit 10 µg/ ml Mitomycin C (Sigma) behandelt, um deren Zellteilung irreversibel zu inhibieren. Die inhibierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in Gelatine-beschichtete 10 cm Zellkulturschalen eingesät.

3.4.2 Kultur und Transfektion embryonaler Stammzellen

Eingefrorene ES-Zellen wurden in ES-Zellkulturmedium (Kap. 2.7) aufgenommen, vereinzelt und in 10 cm Zellkulturschalen auf Fibroblasten kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen alle ein bis zwei Tag passagiert (1:3 bis 1:6). Dies sollte verhindern, dass die Zellen konfluent werden und über diese Zellkontakte anfangen auszudifferenzieren. Für die Transfektion wurden 1.2×10^7 exponentiell wachsende ES-Zellen mit 20-40 µg linearisiertem Rekombinationsvektor in 800 µl PBS vermischt, in eine Elektroporationsküvette (Gene-Pulser® Küvette 0.4 cm, BioRad) überführt und bei 300 V, 1200 µF (2 ms Impuls) elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen auf drei 10 cm Zellkulturschalen mit Fibroblasten ausgesät.

3.4.3 Selektion und Isolation embryonaler Stammzellklone

Zwei Tage nach der Elektroporation wurde begonnen, ES-Zellklone mit homologer Rekombination, die über den Rekombinationsvektor eine Neomycinresistenz erhielten, durch Zugabe von 400 µg/ ml Geneticin (Sigma) positiv zu selektionieren. Nach 7-10 Tagen konnten resis-

tente Klone isoliert werden. Hierfür wurden die ES-Zellklone einmal mit PBS gewaschen, mit PBS überschichtet und einzelne Klone unter dem Lichtmikroskop mit einer Pipettenspitze in etwa 25 µl PBS in eine 96-Loch Platte überführt. In dieser Platte wurden die Zellen anschließend mit 25 µl Trypsinlösung für 5 min inkubiert, nach Zugabe von 50 µl ES-Zellmedium vereinzelt und auf 96-Loch-Platten mit Fibroblasten überführt. Zwei bis drei Tage später wurden die Zellen auf zwei neue 96-Loch Platten passagiert, die eine Hälfte auf neue Fibroblasten zur späteren Kryokonservierung, die andere Hälfte auf Gelatine-behandelte Platten. Die auf Fibroblasten gewachsenen ES-Zellen wurden nach zwei bis drei Tagen bei Erreichen großer Einzelkolonien eingefroren. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 5 min bei 37°C trypsinisiert, durch Zugabe von 75 µl Einfriermedium (10 % DMSO, 50 % FCS, 40 % ES-Zellkulturmedium) gut vereinzelt und bei -80°C weggefroren. Die auf Gelatine eingesäten Klone wurden bis zur Konfluenz weiterkultiviert, die genomische DNA isoliert (Kap. 3.1.5.2) und die homologe Rekombination mittels Southern-Hybridisierung (Kap. 3.3.15) ermittelt. Klone, die eine korrekte Rekombination aufwiesen, wurden anschließend in den kryokonservierten 96-Loch-Platten aufgetaut und in Kultur expandiert.

3.4.4 Superovulation und Präparation von Blastozysten

Zur Gewinnung von Blastozysten wurden ca. 25 Tage alte C57BL/6-Weibchen durch intraperitoneale Hormongabe zur Superovulation gebracht. Hierfür wurden den Tieren zunächst 100 µl 50 U/ ml PMS/PBS (*Pregnant Mare's Serum*, Intergonan, Intervet GmbH, Tönisvorst) injiziert. Zwei Tage später erfolgte die Injektion von 100 µl 50 U/ ml HCG/PBS (humanes Chorion-Gonadotropin, Ovogest, Intervet) und die Verpaarung mit C57BL/6-Männchen. Eine erfolgreiche Kopulation wurde am folgenden Tag durch einen Vaginalpfropf angezeigt und als Tag 0.5 *post coitum* (p.c.) definiert. 3.5 Tage p.c. wurden die Blastozysten aus den Eileitern mit Hilfe einer Mundkapillare mit Blastozysten-Medium (30 mM Hepes pH 7.2 in Fibroblasten-Medium) herausgespült und bis zur Injektion der ES-Zellen unter Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) bei 37°C aufbewahrt.

3.4.5 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten und Uterustransfer

Die Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten wurde mit einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit Mikromanipulator (Brindi AG, Basel bzw. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Halte- und Injektionsnadeln wurden von Eppendorf bezogen. Die injizierten Blastozysten wurden in pseudoträchtige CB6F1-Weibchen transferiert (Hogan, et. al., 1994), die durch Kopulation mit vasktomierten Männchen den Hormonhaushalt eines trächtigen Tieres aufweisen. 2.5 Tage p.c. wurden die pseudoschwangere Leihmütter betäubt (50 µl Ketavet und 50 µl Rompun pro 10 g Körpergewicht, Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH, Garbsen), die Eileiter freigelegt und sechs bis acht Blastozysten mit der Mundkapillare in jeden Eileiter transferiert. Anschließend wurde das Peritoneum vernäht und die Haut mit einer Wundklammer verschlossen.

3.5 Statistische Auswertungen

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz von Messergebnissen wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test nach Student oder der ungepaarte Mann-Whitney-Test verwendet. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte \pm SD (*standard deviation*) oder \pm SEM (*standard error of mean*) dargestellt. Werte von $P \leq 0.05$ gelten als statistisch signifikant. P-Werte ≤ 0.05 wurden mit einem Stern, ≤ 0.01 mit zwei Sternen und ≤ 0.001 mit drei Sternen gekennzeichnet. Überlebenskurven wurden mit Hilfe des Log-rank (Mantel-Cox) Test kalkuliert.

4 Ergebnisse

Identifikation CXCR7 vermittelter Funktionen in der physiologischen und pathophysiologischen T-Zellentwicklung

4.1 CXCR7 und CXCR4 weisen unterschiedliche Expressionsprofile in der murinen und humanen T-Zell-Entwicklung auf

4.1.1 CXCR7 und CXCR4 werden in der thymischen T-Zellentwicklung invers exprimiert

Für CXCR4 wurden in den vergangenen Jahren bedeutende Funktionen in der Thymopoese beschrieben. Dazu gehört die CXCR4 vermittelte Migration doppelt negativer (DN) Thymozyten in die subkapsuläre Zone des thymischen Kortex (Plotkin *et al.*, 2003), aber auch die Funktion von CXCR4 als Kostimulator während der thymischen β -Selektion (Tramont *et al.*, 2010). Im Gegensatz hierzu sind Funktionen von CXCR7 in der thymischen T-Zellentwicklung bisher völlig unbekannt. Die Deletion des *CXCR7*-Gens in CXCR7-KO-Mäusen hatte keine Defekte in der Entwicklung von B-Zellen und Granulozyten in der fötalen Leber und im Knochenmark ergeben. Hieraus wurde geschlossen, dass CXCR7 keine Funktionen in der Hämatopoese besitzt (Sierro *et al.*, 2007). In diesem Ansatz wurde jedoch nicht die T-Zellentwicklung im adulten Thymus berücksichtigt. Während für unreife Thymozyten und periphere T-Zellen die CXCR4-Expression bekannt ist, wird die CXCR7 Expression in Thymozyten und T-Zellen äußerst kontrovers diskutiert (Balabanian *et al.*, 2005; Berahovich *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2008; Tramont *et al.*, 2010). Um nun grundlegend etwas über CXCR7 Funktionen in der T-Zellentwicklung erfahren zu können, war es daher zunächst ein Ziel der Arbeit, die CXCR7 und CXCR4 Expression in verschiedenen Thymozyten- und peripheren T-Zellpopulationen zu verifizieren. Im ersten Schritt wurde hierfür die Genexpression von CXCR7 und CXCR4 in verschiedenen murinen Thymozytenpopulationen mittels quantitativer RT-PCR und Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 10). Die quantitative RT-PCR-Analyse ergab ein inverses Expressionsprofil für CXCR7 und CXCR4 in den Thymozytenstadien doppelt-negativ (DN) 3 ($CD4^-CD8^-CD44^-CD25^+$), DN4 ($CD4^-CD8^-CD44^-CD25^-$), doppelt-positiv (DP) ($CD4^+CD8^+$), $CD4^+$ und $CD8^+$. So waren DN3 und $CD8^+$ Thymozyten durch

niedrige CXCR7 und hohe CXCR4 Expressionslevel, dagegen DN4 und $CD4^+$ Thymozyten durch hohe CXCR7 und niedrige CXCR4 Expressionslevel charakterisiert (Abb. 10-A).

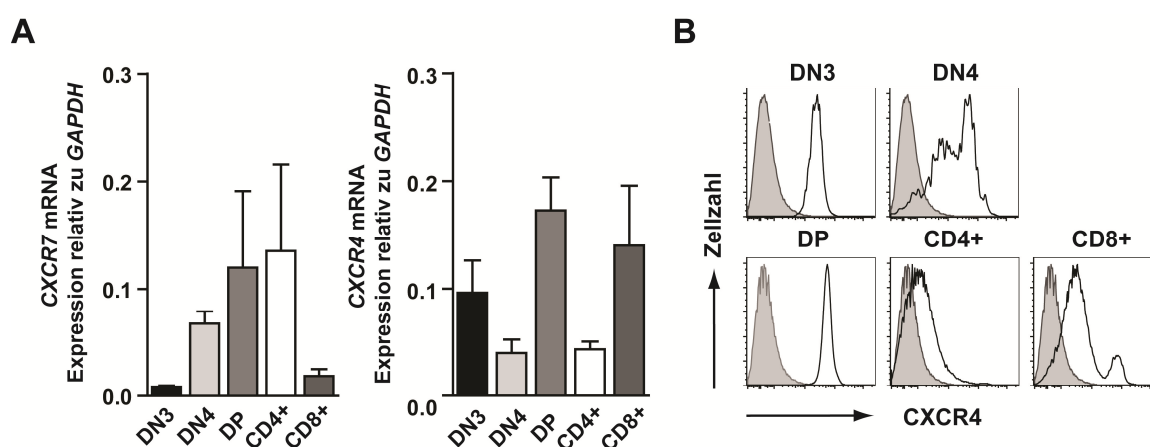


Abb. 10: CXCR7 und CXCR4 weisen inverse Genexpressionsprofile während der Thymozytenentwicklung auf (A) Die Genexpression von murinem CXCR7 und CXCR4 in verschiedenen Thymozytenpopulationen wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Hierfür wurden Thymozyten von C57BL/6 Mäusen isoliert, $CD4-CD8-CD44-CD25^+$ (DN3), $CD4-CD8-CD44-CD25^-$ (DN4), $CD4^+CD8^+$ (DP), $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozytensubpopulationen mittels FACS-Sortierung aufgereinigt und RNA gewonnen. Die Genexpression wurde normalisiert zur GAPDH Expression der einzelnen Populationen. Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ($n = 9$ Mäuse) als Mittelwerte \pm SEM. (B) Die CXCR4 Oberflächenexpression auf verschiedenen Thymozytenpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des CXCR4 Antikörpers Klon 2B11 analysiert (Isotypkontrolle, graue Kurven). DN, doppelt negativ; DP, doppelt positiv.

Die alternierenden Expressionslevel von CXCR4 konnten auch auf Antigenebene mittels Durchflusszytometrie detektiert werden (Abb. 10-B). Deutlich korrelierte die CXCR4 mRNA-Expression mit der CXCR4 Oberflächenexpression auf den einzelnen Thymozytenstadien. Für CXCR7 konnte in der Durchflusszytometrie weder eine Oberflächen-, noch eine intrazelluläre Expression in den Thymozytenstadien nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf ein Versagen des verwendeten CXCR7-Antikörpers zurückzuführen, der ursprünglich gegen humanes CXCR7 in Mäusen generiert wurde. Andere Durchflusszytometrie-taugliche Antikörper gegen murines CXCR7 waren nicht verfügbar. Alternativ wurde daher die CXCR7 Expression in aufgereinigten Thymozytensubpopulationen unter Verwendung eines polyklonalen anti-Maus/ Human CXCR7-Antikörpers aus dem Schaf im Westernblot analysiert (Abb. 11). Die Westernblot-Analyse der Thymozytenstadien ergab eine positive Expression von CXCR7 in $CD4^+$ Thymozyten (Abb. 11-A). Diese wiesen die erwartete CXCR7-Bande unterhalb von 55 kDa auf. Für alle anderen Thymozytenstadien wurden nur äußerst schwache Banden bei etwa 55 kDa detektiert, welche möglicherweise postrational modifizierte Formen des Rezeptors darstellen. Die Bindungsspezifität des verwendeten CXCR7 Antikörpers konnte in HEK293 Zellen, die den Rezeptor endogen exprimieren, mit Hilfe von siRNAs verifiziert werden (Abb. 11-B). So führte die zweifache Behandlung der Zellen mit einer CXCR7 spezi-

fischen siRNA zur Herunterregulation der endogenen CXCR7 Expression auf 60 % des Wertes für Kontroll-siRNA behandelte Zellen.

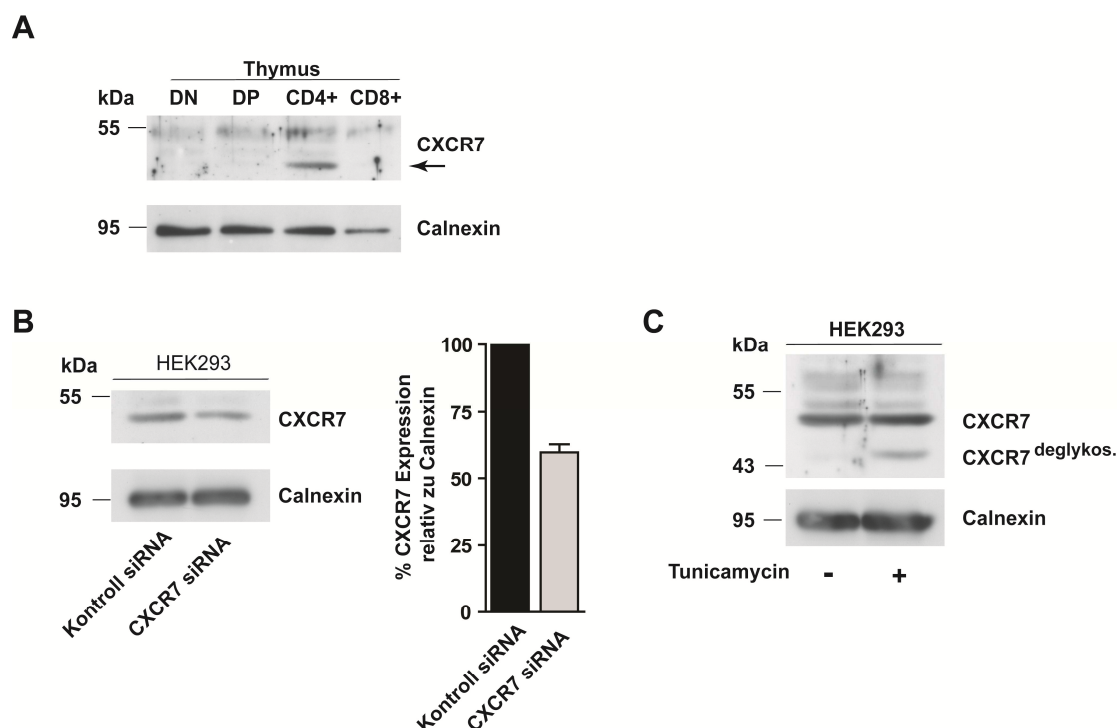


Abb. 11: CXCR7 wird intrazellulär in murinen Thymozyten exprimiert (A) CD4-CD8- DN, CD4+CD8+ DP und CD4+ bzw. CD8+ einfach positive Thymozyten aus C57BL/6 Mäusen wurden mittels FACS-Sortierung aufgereinigt, lysiert und im Westernblot auf eine CXCR7 Expression analysiert. (B) Die Bindungsspezifität des verwendeten Antikörpers wurde auf Proteinlysaten von HEK293-Zellen verifiziert, in denen endogenes CXCR7 mittels einer siRNA gegen CXCR7 herunterreguliert wurde. (C) Zum Nachweis N-glykosylierter Formen von CXCR7 wurden HEK293A-Zellen für 24 Stunden mit 0.5 µg/ ml Tunicamycin behandelt und anschließend im Westernblot analysiert. DN, doppelt negativ; DP, doppelt positiv; deglykos., deglykosyliert.

Da für CXCR7 N-Glykosylierungsstellen vorhergesagt wurden (Heesen *et al.*, 1998), war anzunehmen, dass eine Tunicamycin-Behandlung zum Auftreten einer zusätzlichen CXCR7-Bande von unglykosyliertem Rezeptor im Westernblot führt. Diese konnte in Proteinlysaten von Tunicamycin-behandelten HEK293 Zellen oberhalb von 43 kDa detektiert werden (Abb. 11-C).

4.1.2 CXCR7 Protein Expression ist intrazellulär in peripheren T-Zellen nachweisbar

Im nächsten Schritt galt es die Expression von CXCR4 und CXCR7 auf humanen und murinen peripheren T-Zellpopulationen zu bestimmen. Humane periphere T-Zellen aus dem Blut wurden hierfür mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 12). Während CXCR4 auf

CD3⁺ T-Zellen oberflächlich gut detektierbar war, wies CXCR7 nur eine marginale Oberflächenexpression auf. Eine deutliche CXCR7 Expression war jedoch intrazellulär in permeabilisierten T-Zellen vorzufinden (Abb. 12-A).

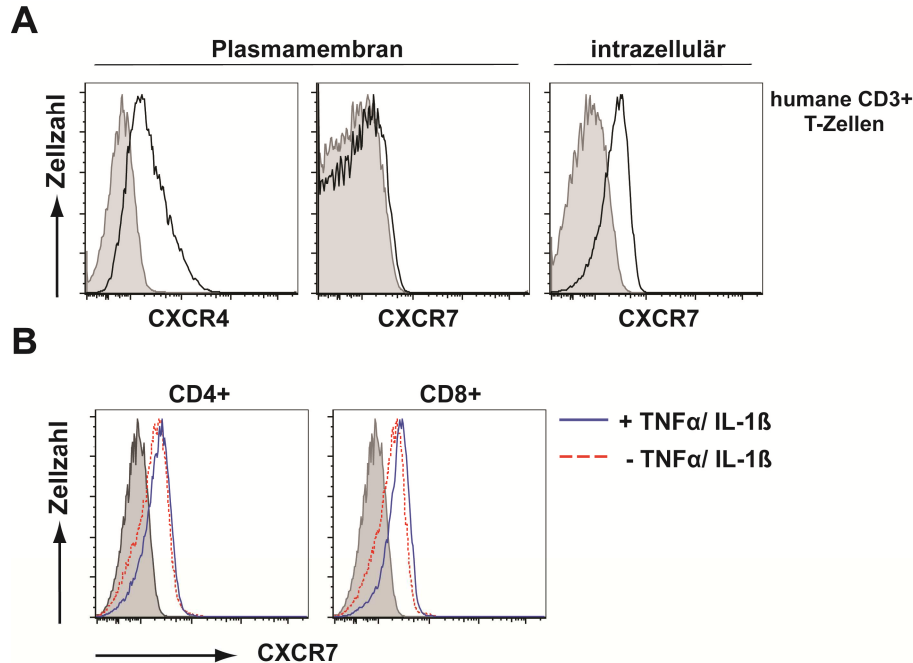


Abb. 12: CXCR7 wird intrazellulär in humanen peripheren T-Zellen exprimiert (A) Leukozyten aus humanem Blut wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen CD3, CXCR7 (Klon 11G8) und CXCR4 (Klon 44717) analysiert (Isotypkontrolle, graue Kurven). Die CXCR7 Expression wurde zusätzlich zur Oberflächenexpression intrazellulär in permeabilisierten T-Zellen nachgewiesen. (B) Zur Induktion von NFκB regulierten Signaltransduktionswegen in humanen T-Zellen wurden frisch isolierte Leukozyten in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 ng/ ml TNFα und 10 ng/ ml IL-1β für zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde die intrazelluläre CXCR7 Expression in permeabilisierten CD4 und CD8 positiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Da angenommen wird, dass die Promotoraktivität von CXCR7 über den Transkriptionsfaktor NFκB reguliert wird (Jin *et al.*, 2009), wurden zusätzlich humane T-Zellen für 48 Stunden mit den NFκB induzierenden Zytokinen TNFα und IL-1β stimuliert. Dies führte jedoch weder zu einer erhöhten Oberflächen-, noch zu einer intrazellulären Expressionserhöhung von CXCR7 in CD4⁺ und CD8⁺ humanen T-Zellen (Abb. 12-B). Die NFκB-Stimulation allein schien somit nicht in der Lage zu sein, in humanen T-Zellen eine CXCR7 Expression zu induzieren. Anders verhielt es sich im Kontext einer T-Zellaktivierung. In CD3/ CD28 aktivierten humanen CD8⁺ T-Zellen konnten erhöhte CXCR7 Expressionslevel im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 13). Infolge der T-Zellaktivierung war eine zeitabhängige Zunahme der CXCR7 Expression in humanen CD8⁺ T-Zellen zu beobachten (Abb. 13-A). Auch murine CD3/ CD28 aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Milz wiesen im Vergleich zu naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eindeutig erhöhte CXCR7 Expressionslevel auf (Abb. 13-B). In beiden Analy-

sen war erneut das Auftreten von drei CXCR7-spezifischen Banden unterhalb von 55 kDa zu beobachten. Auch hier ist anzunehmen, dass die oberen beiden Banden posttranslational modifizierte Formen von CXCR7 darstellen. Diese scheinen Zell-spezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt vorzuliegen.

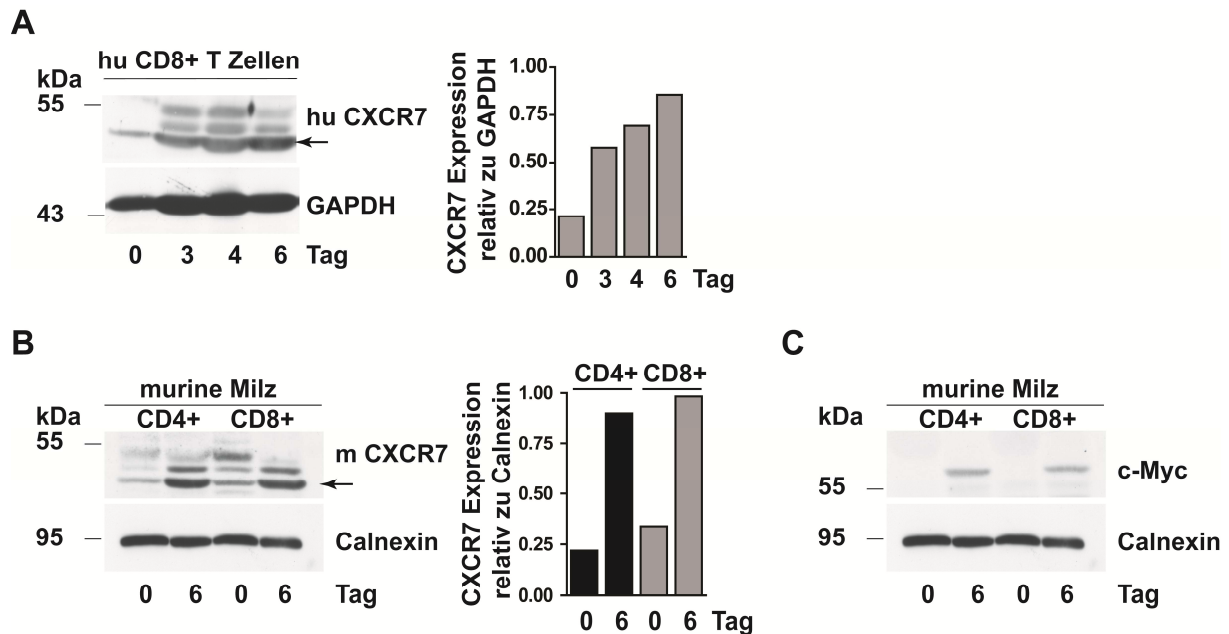


Abb. 13: CXCR7 wird in aktivierten peripheren humanen und murinen T-Zellen exprimiert (A) CD8⁺ T-Zellen aus humanem Blut wurden für zwei Tage auf CD3/ CD28 beschichteten Zellkulturplatten aktiviert und bis zum Tag sechs in Anwesenheit von IL-2 und IL-7 weiterkultiviert. An den Tagen 0, 3, 4 und 6 der Kultur wurden Proteinlysate hergestellt und die CXCR7 Expression im Westernblot analysiert. Als Ladekontrolle diente die Expression von GAPDH. (B) Zusätzlich wurde die CXCR7 Expression in naiven und aktivierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen aus murinen Milzen nachgewiesen. Für die Aktivierung wurden die T-Zellen für zwei Tage mit CD3/ CD28 Antikörpern stimuliert und bis zum Tag sechs in Anwesenheit von IL-2 und IL-7 weiterkultiviert. Als Ladekontrolle diente die Calnexinexpression. (C) c-Myc Expression in naiven und aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus murinen Milzen. Hu, human; m, murin.

Zusätzlich beinhaltete die Westernblot-Analyse der murinen T-Zellen auch die Detektion des Transkriptionsfaktors c-Myc. c-Myc wird infolge der TCR-Signaltransduktion induziert und ist an der Vermittlung der T-Zellproliferation beteiligt. Erhöhte c-Myc Expressionslevel waren in aktivierten, CXCR7 hoch exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachweisbar.

Zur näheren Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von CXCR7 in T-Zellen wurden humane CD8⁺ T-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. 14). Es stellte sich heraus, dass CXCR7 vor allem intrazellulär in frühen Endosomen unterhalb der Plasmamembran lokalisiert war. Während die CXCR7-Färbung nicht mit dem Plasmamembran Marker CD8 und dem Golgi-Marker GM130 kolokalisierte, war eine Kolokalisation mit dem frühen Endosomenmarker EEA1 sichtbar.

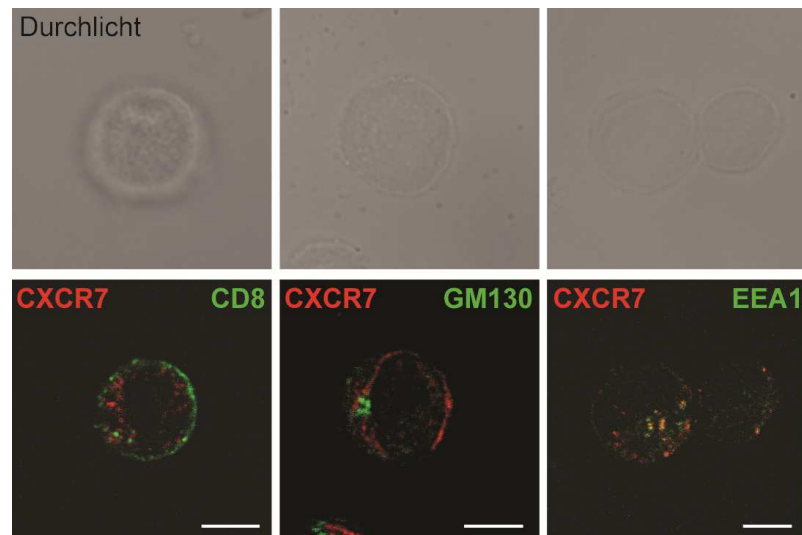


Abb. 14: CXCR7 kolokalisiert mit dem frühen Endosomenmarker EEA1 Periphere T-Zellen aus humanem Blut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und für zwei Tage auf CD3/ CD28 beschichteten Platten kultiviert. CD8+ T-Zellen wurden anschließend nach 3 Tagen aufgereinigt, auf Objektträgern fixiert, permeabilisiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CXCR7 (rot) und CD8, GM130 oder EEA1 (grün) gefärbt (Überlagerungsfarbe: gelb; Maßstab: 5 µm).

Zusammengefasst kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass CXCR4 während der gesamten T-Zellentwicklung oberflächlich exprimiert wird und streng regulierte Expressionsspiegel während der Thymopoese aufweist. CXCR7 hingegen besitzt ein inverses Expressionsprofil während der Thymopoese und ist vor allem intrazellulär in Thymozyten und peripheren T-Zellen lokalisiert. Die physiologische Proteinexpression in Thymozyten ist jedoch relativ gering. Eine aktivierungsabhängige Hochregulation des Rezeptors erfolgt in peripheren humanen und murinen T-Zellen.

4.2 CXCR7 wird in humanen Leukämien und Lymphomen exprimiert

4.2.1 Humane T-ALL-, T-Lymphom- und klassische Hodgkin-Lymphom-Zelllinien exprimieren CXCR7

CXCR7 ist bekannt dafür, präferentiell in entarteten Zellen exprimiert zu werden. Beispiele hierfür sind zahlreiche Tumorzelllinien, aber auch primäre Tumore wie Brust-, Lungen- und Prostatakrebs (Burns *et al.*, 2006). Es stellte sich nun die Frage, ob CXCR7 neben der physiologischen Expression in T-Zellen auch eine pathophysiologische Expression in T-Zell abhängigen hämatopoetischen Neoplasien aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene T-ALL und T-Lymphomzelllinien auf eine Expression von CXCR7 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zusätzlich wurden diese Untersuchungen aufgrund von Ge-

nexpressionsanalysen an M. Hodgkin-Tumorzelllinien (freundlicherweise kommuniziert durch Dr. Stephan Mathas, Charité Virchow-Klinikum) auf Hodgkin-Zelllinien erweitert (Abb. 15).

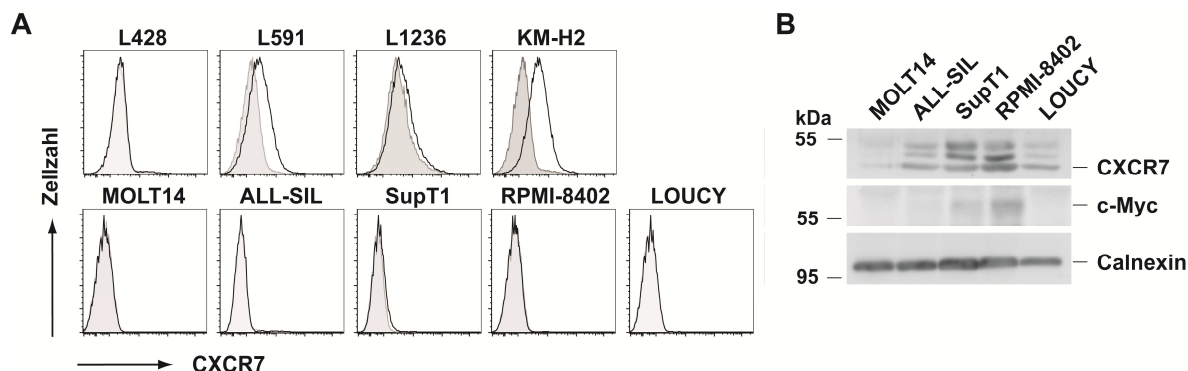


Abb. 15: CXCR7 wird in humanen Hodgkin-Lymphom-, T-Zell-Lymphom- und T-ALL-Zelllinien exprimiert (A) Die Oberflächenexpression von CXCR7 auf verschiedenen humanen klassischen Hodgkin-Lymphomzelllinien, cHL (obere Reihe), T-ALL-Zelllinien (untere Reihe) und auf der T-Lymphomzelllinie SupT1 (untere Reihe) wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des monoklonalen CXCR7 Antikörpers 11G8 analysiert (Isotypkontrolle, graue Kurven). Die T-ALL-Zelllinien und SupT1-Zellen wurden zusätzlich auf eine intrazelluläre CXCR7 und c-Myc-Expression mittels Westernblot-Analyse überprüft (B).

Während zwei der getesteten Hodgkin-Lymphomzelllinien eine deutliche CXCR7 Oberflächenexpression aufwiesen (Abb. 15-A; obere Reihe), war CXCR7 in den T-ALL-Zelllinien ALL-SIL, RPMI-8402 und LOUCY sowie in der T-Lymphomzelllinie SupT1 nur intrazellulär mittels Westernblot nachweisbar (Abb. 15-B). Da der Transkriptionsfaktor c-Myc nicht nur infolge der TCR, sondern auch infolge der präTCR-Signaltransduktion induziert wird und putativ onkogene Eigenschaften besitzt, wurde die Detektion der c-Myc Expression ebenfalls in die Westernblot-Analyse der Zelllinien mit einbezogen. Vergleichbar zur Analyse von murinen aktivierten T-Zellen (Abb. 13) korrelierten auch hier erhöhte c-Myc Expressionslevel mit einer hohen CXCR7 Expression in Zelllinien wie SupT1 und RPMI-8402.

4.2.2 CXCR7 wird in primären T-ALLs und klassischen Hodgkin-Lymphomen exprimiert

Nachdem in der Arbeit eine CXCR7-Expression in T-ALL- und in klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL)-Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurden im nächsten Schritt primäre humane akute lymphoblastische T-Zellleukämien sowie primäre cHLs auf eine CXCR7 Expression überprüft. Die Analysen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Ioannis Anagnostopoulos (Institut für Pathologie, Charité Berlin) mittels Immunhistochemie durchgeführt (Abb. 16).

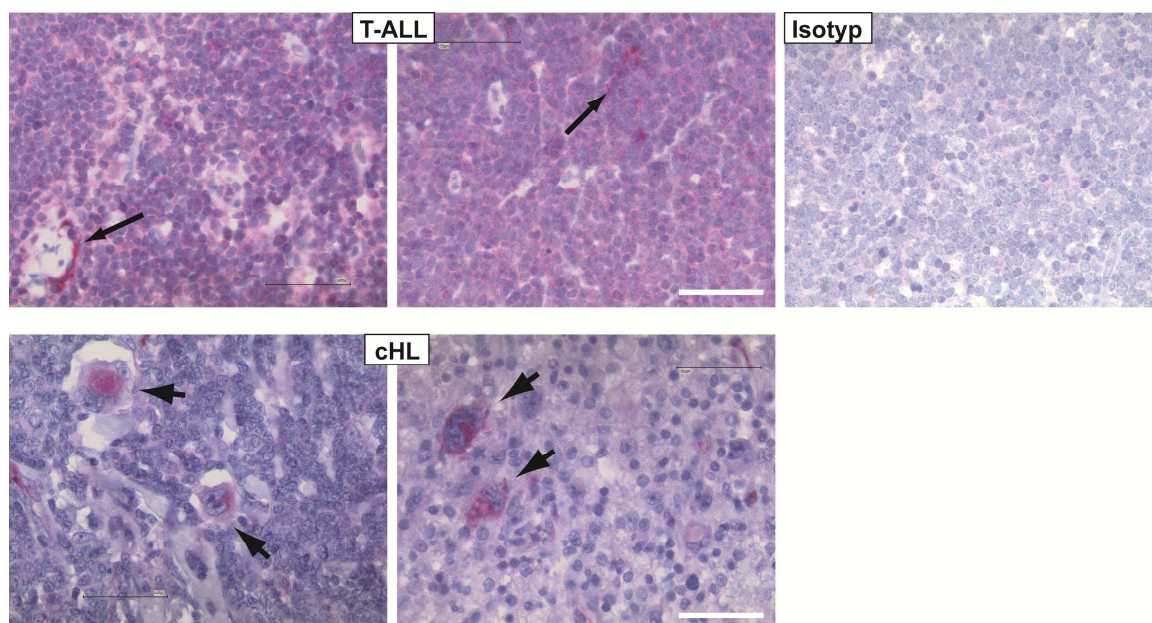


Abb. 16: Primäre lymphoblastische T-Zellleukämie- und klassische Hodgkin-Lymphomzellen exprimieren CXCR7 In situ Nachweis der CXCR7 Expression in humanen T-ALL- und cHL-Proben. Die Immunhistochemische Detektion der CXCR7 Expression erfolgte auf Paraffin-eingebetteten Gewebeproben von T-ALL und cHL Patienten unter Verwendung des CXCR7-Antikörpers Klon 11G8. In der oberen Reihe sind gefärbte T-ALL-Proben im Vergleich zur Isotypkontrolle (rechts) dargestellt. Die Pfeile deuten auf stark gefärbte Gefäßendothelien hin. In der unteren Reihe sind intensive CXCR7 Färbungen in malignen HRS Zellen (Pfeilspitzen) von cHL-Proben erkennbar (Maßstab: 50 µm).

Die immunhistochemische Färbung von einzelnen T-ALLs und cHL-Gewebeproben ergab eine deutliche CXCR7 Expression *in situ*. In 10/48 T-ALL Fällen war das Färbungsmuster durch eine positive zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen charakterisiert. Eine exklusive Oberflächenfärbung konnte nicht beobachtet werden. Lymphatische Endothelien, für die eine CXCR7 Expression bekannt ist, wiesen eine intensive Rezeptorfärbung auf und dienten daher als Positiv-Kontrolle. In 7/48 cHL Gewebeproben war eine starke Rezeptorfärbung in den malignen Hodgkin/ Reed-Sternberg (HRS) Zellen nachweisbar. Infiltrierte nicht-maligne Lymphozyten wiesen dagegen eine wesentlich geringere Rezeptorexpression auf.

Zusammengefasst ergeben die vorliegenden Daten, dass CXCR7 physiologisch in Thymozyten nur sehr gering, verstärkt dagegen in peripheren aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Pathophysiologisch ist CXCR7 hingegen in Fällen von akuten T-Zellleukämien, aber auch klassischen Hodgkin-Lymphomen vorhanden. Im Folgenden galt es nun potentiell physiologische bzw. pathophysiologische Funktionen von CXCR7 in Thymozyten und T-Zellen näher zu charakterisieren.

4.3 CXCR7 unterstützt die intrathymische Differenzierung von thymischen Vorläuferzellen

Um die potentielle Rolle einer CXCR7 Expression während der Hämatopoese studieren zu können, wurde die Methode der retroviralen Überexpression in hämatopoetischen Knochenmarkvorläuferzellen im Mausmodell gewählt. Zusätzlich sollte mit diesem Verfahren Aufschluss darüber gewonnen werden, in welche Differenzierungs- und Wachstumsprozesse eine CXCR7-Rezeptoraktivität bei der malignen Entartung hämatopoetischer Neoplasien eingreifen kann. Gegenüber einem KO-Maus Ansatz weist das Überexpressionsmodell den Vorteil auf, dass es mehr der putativen pathophysiologischen Überexpression von CXCR7 in T-Zellleukämien und Lymphomen entsprechen könnte. Zusätzlich erlaubt dieses Modell, den Einfluss einer konstitutiven CXCR7 Expression auf CXCR4 abhängige Funktionen in hämatopoetischen Zellpopulationen zu studieren. Dies ist vor allem in Zellpopulationen von Vorteil, in denen CXCR4 und CXCR7 inverse Expressionsmuster aufweisen, wie es in der Arbeit für die Thymozytenstadien gezeigt werden konnte.

Für die konstitutive Expression von CXCR7 im hämatopoetischen System wurden Linien-negative Knochenmarkvorläuferzellen aus C57BL/6 Mäusen retroviral mit humanem CXCR7 bzw. einer EGFP-Mockkontrolle transduziert. Das humane *CXCR7*-Gen wurde gewählt, um später in den Mäusen die CXCR7 Expression mittels der einzig verfügbaren anti-human CXCR7 monoklonalen Antikörper in der Durchflusszytometrie sicher detektieren zu können (Abb. 17). 24 Stunden nach erfolgter retroviraler Transduktion war CXCR7 auf der Oberfläche von CXCR7 transduzierten, jedoch nicht auf Mock-transduzierten Knochenmarkvorläuferzellen zu detektieren (Abb. 17-A). Beide Ansätze wiesen vergleichbar hohe CXCR4 Expressionslevel auf. Die Transduktionseffizienzen betrugen zwischen 20-40% GFP-positive Zellen, wobei für Mock-transduzierte Zellen in der Regel höhere Transduktionseffizienzen erhalten wurden. Die retroviral transduzierten Lin⁻CD45.2⁺ Vorläuferzellen wurden in letal bestrahlte CD45.2⁺ Empfängermause transferiert und 24-27 Tage später mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Thymus, Milz und Lymphknoten war nach dem Transfer im Vergleich zu Kontrolltieren ein erhöhter prozentualer Anteil an CXCR7⁺GFP⁺ exprimierenden Zellen zu verzeichnen, der für Thymus und Milz statistisch signifikant war (Abb. 17-B und C).

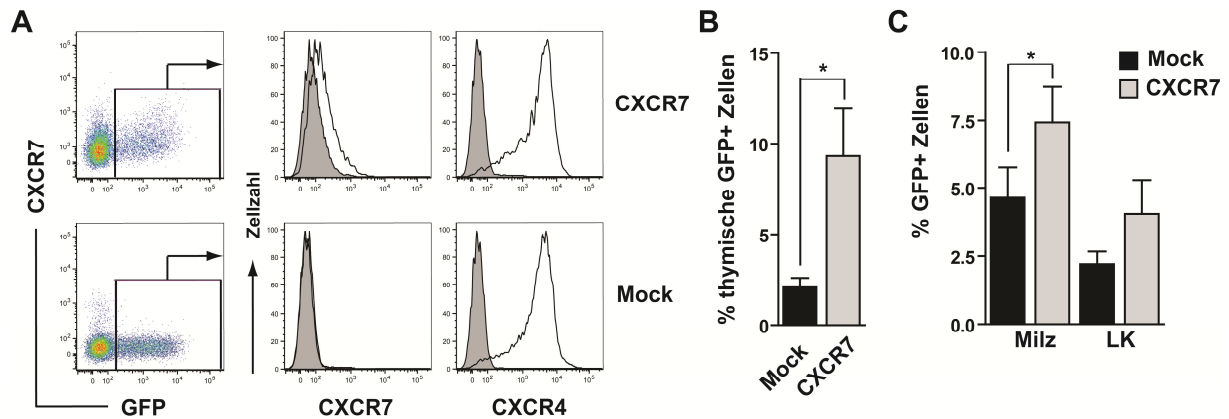


Abb. 17: Erhöhte Repopulation lymphatischer Organe in CXCR7 Knochenmarktransfermäusen
 (A) Linien-negative Knochenmarkvorläuferzellen (CD5-, B220-, CD11b-, Gr-1-, 7-4- und Ter119-) aus C57BL/6 Mäusen wurden durch magnetische Sortierung angereichert und retroviral mit den Konstrukten pMSCV2.2-hCXCR7-IRES-EGFP bzw. der pMSCV2.2-IRES-EGFP Mockkontrolle (Mock) transduziert. Die Transduktionseffizienz (Anzahl an GFP exprimierenden Zellen) sowie die Oberflächenexpression von CXCR7 und CXCR4 wurde 24 Stunden nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert (CXCR7 Antikörper, Klon 8F11-M16; CXCR4 Antikörper, Klon 2B11). (B) Die retroviral transduzierten Knochenmarkvorläuferzellen (CD45.2+) wurden zusammen mit unterstützenden Knochenmarkzellen aus kongenen Mäusen (CD45.1+) in letal bestrahlte Empfängermause (CD45.2+) transferiert. 24-27 Tage nach Transfer wurde der Anteil an GFP exprimierenden Zellen in Thymus (links), Milz und Lymphknoten (rechts) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (n = 7 Mäuse pro Gruppe für den Thymus; n = 9 Mäuse pro Gruppe für Milz und Lymphknoten). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar (*P \leq 0.05). LK, Lymphknoten.

Um feststellen zu können, ob der erhöhte Anteil an CXCR7 exprimierenden Thymozyten die Folge einer beschleunigten Thymus-gerichteten Migration von thymischen Vorläuferzellen (ETPs, *early thymic progenitor cells*) oder das Ergebnis einer verbesserten intrathymischen Differenzierung war, wurde im nächsten Ansatz der Grad des thymischen Chimärismus bestimmt. In diesem Ansatz wurden diesmal exakt gleiche Zahlen an aufgereinigten CXCR7 bzw. Mock-Kontrolle exprimierenden Lin⁻CD45.2⁺ Zellen zusammen mit nicht transduzierten Lin⁻CD45.2⁺ Zellen im Verhältnis 1:5 in subletal bestrahlte CD45.1⁺ kongene Empfängermause transferiert und nach 14 Tagen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Zugabe der nicht transduzierten Zellen sollte sicherstellen, dass beide transduzierten Zellpopulationen die gleichen kompetitiven Wechselwirkungen mit anderen präthymischen Vorläuferzellen erfuhren (Abb. 18). Der thymische Donor-Chimärismus, der durch die Anwesenheit von GFP⁺CD45.1⁻ Zellen im Thymus definiert wurde, betrug 14 Tage nach Transfer 0.029 % \pm 0.009 % SEM für CXCR7 exprimierende Thymozyten und 0.058 % \pm 0.030 % SEM für EGFP Mock-Kontrolle exprimierende Thymozyten. Gleichzeitig wiesen CXCR7 exprimierende Zellen einen erhöhten relativen Anteil an Thymozyten auf, die bereits das doppelt positive Stadium (lin⁺) erreicht hatten (CXCR7: 54,74 % \pm 17,84 % SEM; Mock: 28,13 % \pm 3,43 % SEM). Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

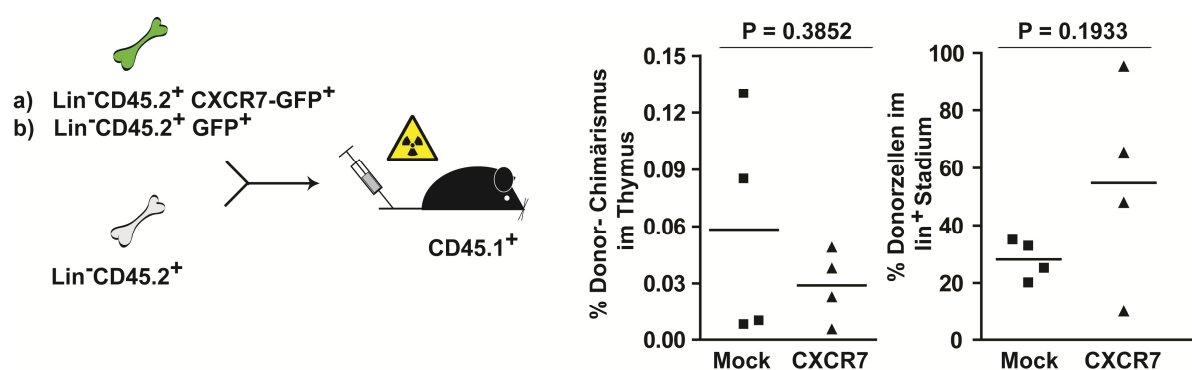


Abb. 18: CXCR7 vermittelt eine effizientere intrathymische Differenzierung von thymischen Vorläuferzellen Linien-negative Knochenmarkvorläuferzellen (CD45.2^+) wurden mit CXCR7 oder der Mock-Kontrolle retroviral transduziert, durch FACS-Sortierung aufgereinigt und in gleicher Zellzahl zusammen mit Linien-negativen, nicht transduzierten Knochenmarkzellen (CD45.2^+) in subletal bestrahlte kongene Empfänger-mäuse (CD45.1^+) transferiert. Das Verhältnis von transduzierten Zellen zu nicht transduzierten Zellen betrug 1:5. 14 Tage nach Transfer wurde der Grad an thymischem Donor-Chimärismus mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Hierfür wurde der prozentuale Anteil an $\text{GFP}^+ \text{CD45.1}^-$ Zellen im Thymus der Empfänger-mäuse bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil an GFP^+ Thymozyten ermittelt, die bereits die Linien-spezifischen Marker CD4, CD8, CD3, B220 und CD11b (lin^+) exprimierten. Dargestellt ist das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass CXCR7 exprimierende Knochenmarkvorläuferzellen keinen Vorteil in der Besiedlung des Thymus durch thymische Vorläuferzellen aufweisen. Der erhöhte Anteil an Lin^+ Zellen in CXCR7 Transfermäusen lässt aber einen intrathymischen Differenzierungsvorteil CXCR7 exprimierender Thymozyten vermuten.

4.4 CXCR7 wirkt zusammen mit CXCR4 als Kostimulator während der thymischen β -Selektion

4.4.1 CXCR7 exprimierende DN-Thymozyten erfahren eine effizientere thymische β -Selektion

CXCR4 wurde vor kurzem als Ko-Stimulator während der thymischen β -Selektion beschrieben (Tramont *et al.*, 2010). Durch Verstärkung präTCR vermittelter Überlebenssignale ermöglicht CXCR4 DN3 Thymozyten ($\text{CD4}^- \text{CD8}^- \text{CD25}^+ \text{CD44}^-$) das DN4 Thymozytenstadium ($\text{CD4}^- \text{CD8}^- \text{CD25}^- \text{CD44}^-$) zu erreichen. So führt eine Blockierung von CXCR4 vermittelten Signalen zu einem reduzierten DN3-zu-DN4 Übergang. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Mausmodell war das Gegenteil, nämlich ein effizienterer DN3-zu-DN4 Übergang in CXCR7 Knochenmarktransfermäusen zu beobachten (Abb. 19).

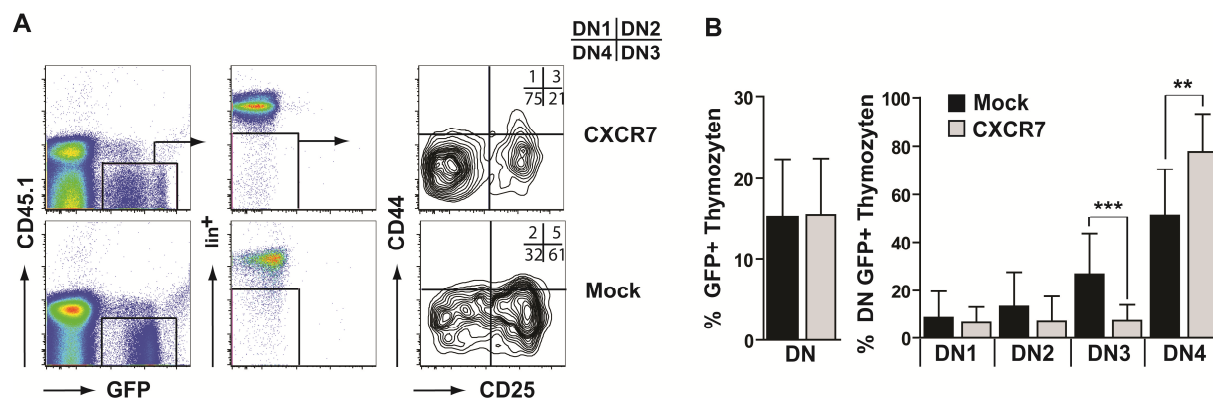


Abb. 19: CXCR7 vermittelt einen effizienteren DN3-zu-DN4 Übergang (A) Linien-negative Knochenmarkvorläuferzellen (CD45.2⁺) wurden retroviral mit CXCR7 oder der Mock-Kontrolle transduziert und zusammen mit Knochenmarkzellen von kongenen Mäusen (CD45.1⁺) in letal bestrahlte Empfängermause (CD45.2⁺) transplantiert. 24-27 Tage nach Transfer wurden CXCR7+GFP+CD45.1- bzw. GFP+CD45.1- (Mock) Thymozyten mittels Durchflusszytometrie identifiziert und zur Unterscheidung der Linien-negativen (lin-) doppelt negativen (DN) Thymozytensubpopulationen DN1-DN4 mit Antikörpern gegen CD44 und CD25 gefärbt. Die Zahlen in den Graphen geben den prozentualen Anteil für jeden Quadranten an. Zu sehen ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängigen Experimenten. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an GFP exprimierenden DN Thymozyten (links) und deren Zusammensetzung an DN1-4 Stadien (rechts) in Mock (schwarze Balken) und CXCR7 (graue Balken) Transfermäusen. Zu sehen ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit n = 14 Mäusen für CXCR7 und n = 9 Mäusen für Mock. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SD. (**P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001).

24-27 Tage nach Transfer von CXCR7 bzw. Mockkontrolle exprimierenden Lin⁻CD45.2⁺ Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Empfängermause waren, trotz gleicher Frequenzen an DN Thymozyten in beiden Transfergruppen (Abb. 19-B, links), signifikant reduzierte Anteile an DN3 Thymozyten und signifikant erhöhte Anteile an DN4 Thymozyten in CXCR7-Transfertieren im Vergleich zu Kontrolltieren zu verzeichnen (Abb. 19-B, rechts). Der Prozentsatz an DP, CD4⁺ und CD8⁺ einfach positiven Thymozyten war dagegen in beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 20-A).

Neben den Thymozytenpopulationen beinhaltete die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkstransfermäuse auch die Untersuchung der Verteilung anderer hämatopoetischer Zellpopulationen in primären und sekundären lymphatischen Organen (Abb. 20). In der Peripherie zeigte es sich, dass CXCR7 exprimierende T-Zellen im Vergleich zu Mock-Kontrolle exprimierenden T-Zellen vermehrt in Blut, Milz und Lymphknoten aufzufinden waren. Vor allem in der Milz konnten signifikant erhöhte Frequenzen an CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bei insgesamt vergleichbarer Zellularität festgestellt werden (Abb. 20-B). Andere hämatopoetische Zellpopulationen, darunter B-Zellen und myeloide Zellen, waren in den primären und sekundären lymphatischen Organen nicht signifikant verändert. Lediglich Ter119⁺CD71⁺ erythroide Vorläuferzellen im Knochenmark waren in CXCR7 Transfermäusen im Vergleich zur Kontrolle vermehrt aufzufinden (Abb. 20-A).

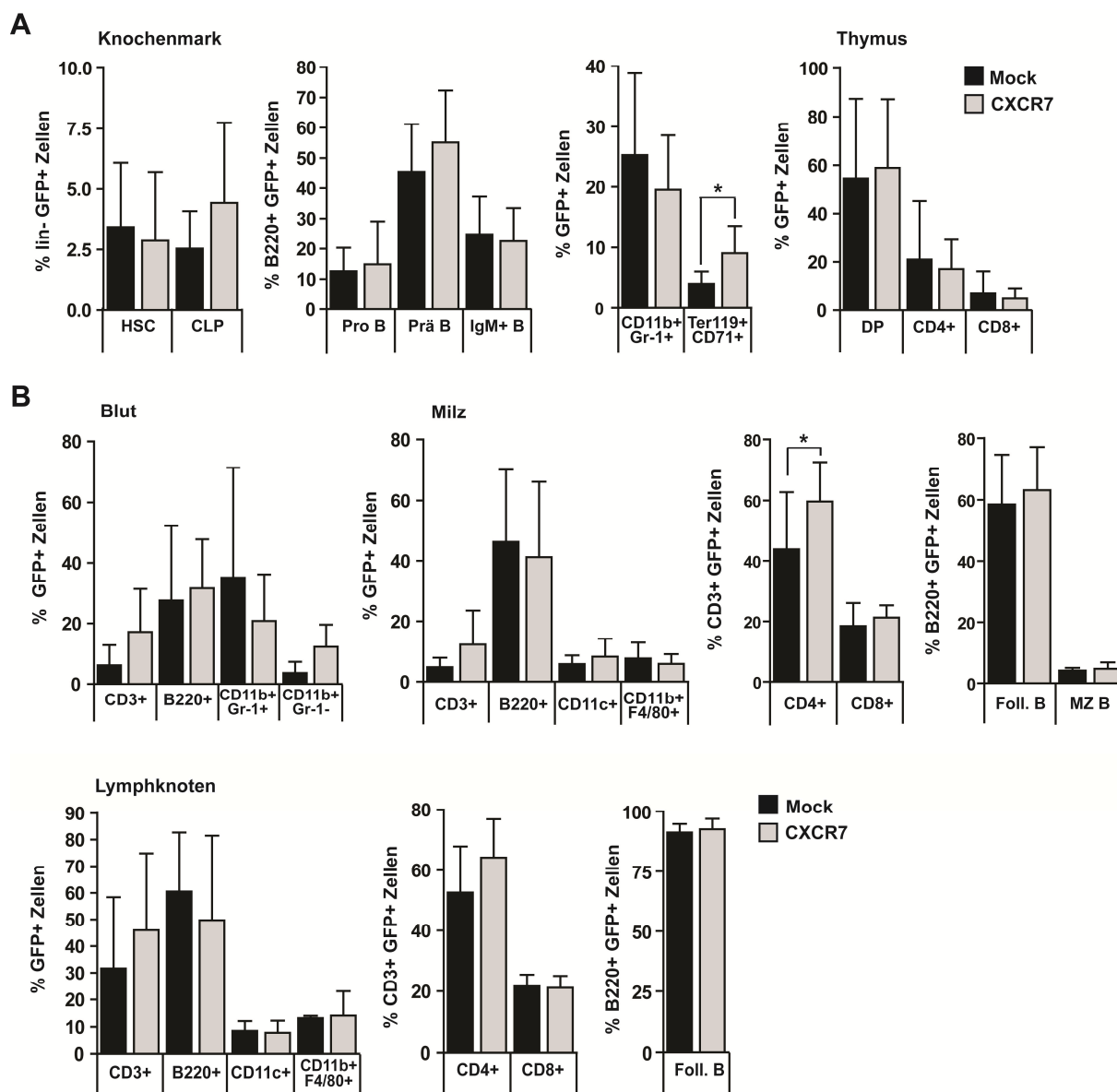


Abb. 20: Die Entwicklung von B-Zellen und myeloiden Zellen wird nicht durch eine konstitutive CXCR7 Expression beeinflusst Linien-negative Knochenmarksvorläuferzellen (CD45.2+) wurden mit CXCR7 oder Mock-Kontroll-Retrovirus transduziert und zusammen mit kongenen Knochenmarkszellen (CD45.1+) in letal bestrahlte Empfängermaße (CD45.2+) transferiert. 24-27 Tage nach Transfer wurden Knochenmark, Thymus, Blut, Milz und Lymphknoten der Empfängermaße entnommen und mittels Durchflusszytometrie die Verteilung an hämatopoetischen Zellpopulationen in CXCR7+GFP+CD45.1- bzw GFP+CD45.1- Kontrollzellen bestimmt. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Mock (schwarze Balken) und CXCR7 (graue Balken) exprimierenden Populationen in Knochenmark und Thymus. Die Zellpopulationen wurden wie folgt identifiziert: Lin-CD117+Sca-1+ HSC (hämatopoetische Stammzelle; Lin = CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, Ter119); Lin-CD117+CD127int CLP (Common lymphoid progenitor); B220+CD43+IgM- Pro-B Zelle; B220+CD43-IgM- Pre-B-Zelle; B220+CD43-IgM+ unreife B-Zelle; CD11b+Gr-1+ Granulozyten und Monozyten; Ter119+CD71+ Erythroide Vorläuferzelle; CD4+CD8+ doppelt positiver (DP) Thymozyt; CD4+ oder CD8+ einfach positiver Thymozyt (n = 10 Mäuse CXCR7 und 5 Mäuse Mock für Knochenmark; n = 14 Mäuse CXCR7 und 9 Mäuse Mock für Thymus). (B) Abgebildet ist der Prozentsatz an Mock und CXCR7 exprimierenden Populationen in Blut, Milz und Lymphknoten. Folgende Oberflächenmarker wurden zur Identifizierung der Subpopulationen verwendet: CD3+ T-Zelle; B220+ B-Zelle; CD11b+Gr-1+ Granulozyt; CD11b+Gr-1- Monozyt; CD3+CD4+ T-Zelle; CD3+CD8+ T-Zelle; B220+CD21intCD23int follikuläre B-Zelle; B220+CD21hochCD23niedrig Marginalzonen (MZ) B-Zelle; CD11c+ dendritische Zelle; CD11b+F4/80+ Makrophage (n = 8 Mäuse CXCR7 und 3 Mäuse Mock für Blut; n = 10-14 Mäuse CXCR7 und 5-8 Mäuse Mock für Milz und Lymphknoten). Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SD (*P \leq 0.05).

Der effizientere DN3-zu-DN4 Übergang in CXCR7 exprimierenden Thymozyten deutete auf eine effizientere thymische β -Selektion hin, die Konsequenz einer kostimulatorischen Funktion von CXCR7 auf CXCR4 vermittelte Überlebenssignale sein könnte. In der Tat waren die Thymozytenstadien DN3 und DN4 von CXCR7 exprimierenden Zellen durch geringere Apoptoseraten als DN3 und DN4-Zellen aus Kontrolltransfertiern charakterisiert (Abb. 21).

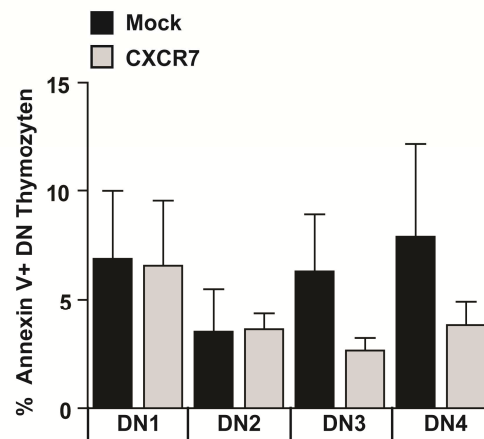


Abb. 21: CXCR7 exprimierende DN3 und DN4 Thymozyten sind weniger apoptotisch Thymozyten aus CXCR7 bzw. Mock-Kontroll-Knochenmarktransförmäusen wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die Apoptoserate der einzelnen Doppelt-negativ (DN) Stadien hin analysiert. Hierfür wurden CXCR7+GFP+CD45.1- Thymozyten (graue Balken) aus CXCR7 Transförmäusen bzw. GFP+CD45.1- Thymozyten (schwarze Balken) aus Mock-Kontrollmäusen zunächst mit Antikörpern gegen CD44 und CD25 gefärbt, um die DN Stadien DN1-4 identifizieren zu können. Deren Apoptoserate wurde anschließend durch Färbung mit Annexin V ermittelt (n = 3 Mäuse pro Gruppe). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass DN Thymozyten aus CXCR7 Transförmäusen im Vergleich zu DN Thymozyten aus Mockkontrolltieren tendenziell reduzierte Frequenzen an Annexin V+ DN3 und DN4 Zellen aufwiesen, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant war.

Allgemein legen die Daten nahe, dass eine konstitutive CXCR7 Expression im hämatopoetischen System einen selektiven Einfluss auf spezifische Zellpopulationen ausübt. Insbesondere die T-Zellentwicklung ist durch eine effizientere thymische β -Selektion und erhöhten T-Zellfrequenzen in der Peripherie gekennzeichnet.

4.4.2 CXCR7 stabilisiert die Oberflächenexpression von CXCR4

In HEK293 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von CXCR7-CXCR4 Heterodimeren mit einer Verstärkung CXCR4-vermittelter Signale assoziiert ist (Levoye et al., 2009; Sierro et al., 2007). Während der thymischen T-Zell Entwicklung könnte eine solche Ausbil-

dung von Heterodimeren auf DN Thymozyten zu einer Stabilisierung der CXCR4 Oberflächenexpression führen und somit potentiell CXCR4 vermittelte Überlebenssignale während der thymischen β -Selektion verstärken. Um zu überprüfen, ob eine konstitutive Expression von CXCR7 einen Einfluss auf die CXCR4-Oberflächenexpression hat, wurden Thymozyten von CXCR7 und Mock-Kontroll-Transfertiern unter der Verwendung von Antikörpern gegen CXCR7 und CXCR4 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 22).

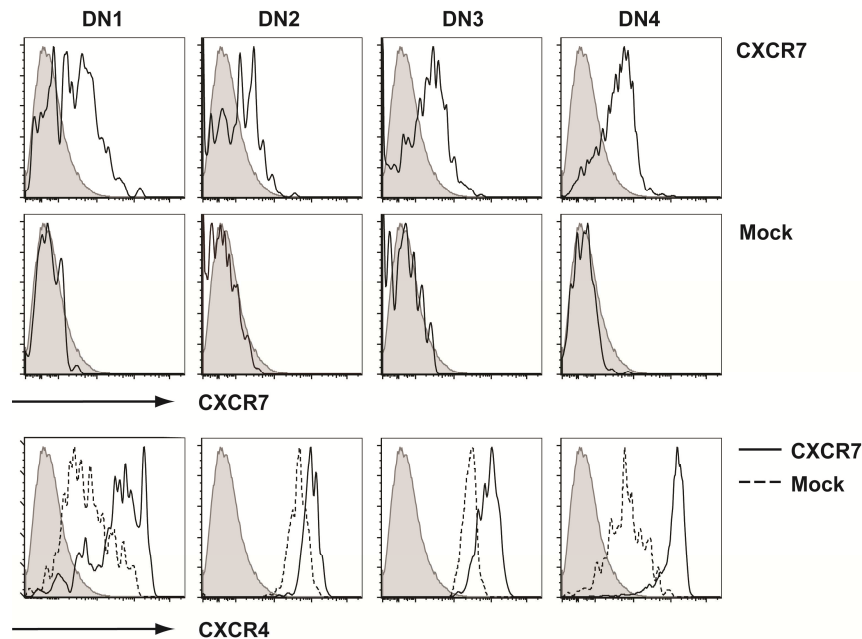


Abb. 22: Konstitutiv exprimiertes CXCR7 führt zur stabilen CXCR4 Oberflächenexpression auf doppelt-negativen Thymozyten Thymozyten aus CXCR7 bzw. Mock-Kontroll-Knochenmarktransfertiern wurden 24-27 Tage nach Transfer isoliert und die Oberflächenexpression von CXCR7 und CXCR4 auf den Thymozytenstadien DN1-4 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die oberen beiden Reihen zeigen die CXCR7 Expression auf den Thymozytenpopulationen von CXCR7 (Reihe 1) und Mock-Transfertiern (Reihe 2). In der unteren Reihe ist die CXCR4 Expression auf den Thymozytenstadien DN1-4 von CXCR7-Transfertiern (durchgezogene Linie) und Mock-Transfertiern (gestrichelte Linie) dargestellt (Isotypkontrolle, graue Kurven). Die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ für $n = 6$ Mäuse pro Gruppe.

Die konstitutive Oberflächenexpression von CXCR7 war auf allen Thymozytenstadien DN1-4 von Thymozyten aus CXCR7-Transfertiern nachweisbar, auf den Thymozyten aus Kontrolltransfertiern dagegen nicht (obere beide Reihen). Deutlich war ein verändertes CXCR4 Expressionsprofil in CXCR7⁺ Thymozytenstadien zu beobachten (untere Reihe). Während Mock-Kontrolle exprimierende Thymozyten das typische CXCR4 Expressionsprofil mit geringeren Leveln im DN1 und DN4-Stadium und höheren Leveln im DN2 und DN3-Stadium aufwiesen, waren alle vier CXCR7 exprimierende Thymozytenpopulationen durch eine konstitutiv hohe CXCR4 Expression charakterisiert.

CXCR7 scheint somit in DN Thymozyten einen funktionellen Komplex mit CXCR4 zu bilden, der während der thymischen β -Selektion zu einem verstärkten DN3-DN4 Übergang führen könnte.

4.4.3 Die CXCR7-vermittelte Effizienzsteigerung der β -Selektion ist Thymozyten-intrinsisch

Es stellte sich nun die Frage, ob die beobachtete Effizienzsteigerung in der thymischen β -Selektion in Anwesenheit von CXCR7 eine Thymozyten-intrinsische Eigenschaft war, die *ex vivo* rekapituliert werden kann, oder ob die Effizienzsteigerung auf CXCR7-abhängige chemotaktische Effekte innerhalb der thymischen Mikroumgebung zurückzuführen war. Um dies beantworten zu können, wurden OP9-DL1 Stromazell-Kokulturen durchgeführt, welche häufig verwendet werden, um Aspekte der Signaltransduktion und Zellbiologie in der Thymopoese *in vitro* nachzuahmen (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002). OP9-DL1 Zellen sind Knochenmarkstromazellen, die den für die Thymopoese essentiellen Notch1-Liganden *Delta-like 1* exprimieren. Für die Kokulturen wurden OP9-DL1 Stromazellen mit CXCR7 bzw. Mock-kontrolle transduzierten Knochenmarkvorläuferzellen für 12 Tage *in vitro* kokultiviert und die Entwicklung von DN3 und DN4 Thymozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 23).

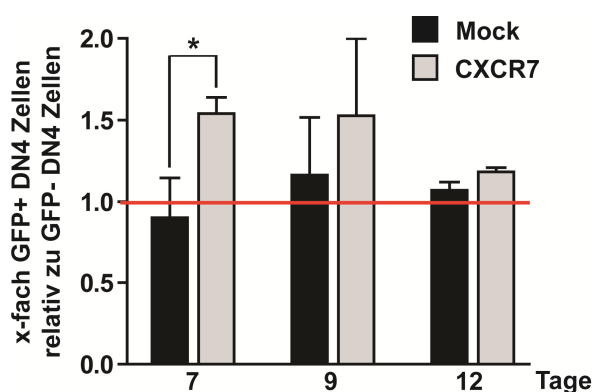


Abb. 23: CXCR7 vermittelt eine effizientere Differenzierung von DN4 Thymozyten *in vitro* Linien-negative Knochenmarkvorläuferzellen wurden retroviral mit CXCR7 bzw. der Mock-Kontrolle transduziert und auf OP9-DL1 Stromazellen in Anwesenheit von IL-7 und Flt3-Ligand für zwölf Tage kultiviert. An den Tagen 7, 9 und 12 wurde die Differenzierung von thymischen Vorläuferzellen in DN3 und DN4 Thymozytenstadien mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Auswertung wurde innerhalb der Lin-CD44--Population (DN3 und DN4-Zellen) das Verhältnis von GFP positiven und GFP negativen DN4 Thymozyten für jeden Zeitpunkt bestimmt. Dargestellt ist der Prozentsatz an GFP+ DN4 Thymozyten als Vielfaches des Prozentsatzes an GFP negativen DN4 Zellen (willkürlich gleich 1 gesetzt, rote Linie) für jede Kokultur. Zu sehen ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SD (n = 9 Mäuse pro Gruppe, *P \leq 0.05).

Innerhalb des beobachteten Zeitraums war ein schnelleres Auftreten von DN4 Thymozyten in Kokulturen mit CXCR7⁺ Knochenmarkzellen im Vergleich zu den CXCR7⁻ Knochenmarkzellen derselben Kokultur zu verzeichnen. Mockkontrolle exprimierende Zellen entwickelten dagegen ungefähr gleich schnell DN4 Thymozyten wie die nicht transduzierten Zellen derselben Kokultur. Der Unterschied zwischen CXCR7 und Mockkontrolle exprimierenden DN4 Zellen war am Tag sieben der Kokultur statistisch signifikant, nahm aber über die Zeit ab. Aus den Daten konnte geschlossen werden, dass CXCR7 DN Thymozyten, welche im Begriff sind, das DN4 Stadium zu erreichen, einen Thymozyten-intrinsischen Differenzierungsvorteil vermittelt.

4.5 CXCR7 verstärkt kooperativ CXCR4-vermittelte Überlebenssignale in Thymozyten

4.5.1 CXCR7 und CXCR4 bilden Liganden-unabhängige Heterodimere

Die im Thymus von CXCR7-Knochenmarktransfermäusen beobachtete Zunahme an DN4 Thymozyten war potentiell auf eine erhöhte Proliferationsrate oder reduzierte Apoptoserate von DN Thymozyten zurückzuführen. Um mechanistisch mehr Einblick in den CXCR7 beschleunigten DN3-zu DN4 Übergang gewinnen zu können, wurde die murine Thymozytenzelllinie SCB.29 mit hCXCR7-IRES-GFP bzw. einem EGFP Mockkontroll-Plasmid durch Elektroporation transfiziert. SCB.29 Zellen sind durch eine positive Expression von CXCR4 und des präTCR charakterisiert und eignen sich daher für mechanistische Untersuchungen der β -Selektion *in vitro*. Die CXCR7 bzw. Mock transfizierten Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 24). Die Transfektionsraten betrugen in der Regel für CXCR7 20-30% GFP⁺ Zellen, für die Mock-Kontrolle 30-50% GFP⁺ Zellen. Eine CXCR7-Oberflächenexpression war nur auf den CXCR7 transfizierten Zellen, jedoch nicht auf den Mock transfizierten Zellen nachweisbar (Abb. 24-A). Die CXCR7 transfizierten Zellen wurden zusätzlich mittels konfokaler Mikroskopie unter Verwendung von Antikörpern gegen CXCR7 und CXCR4 analysiert (Abb. 24-B).

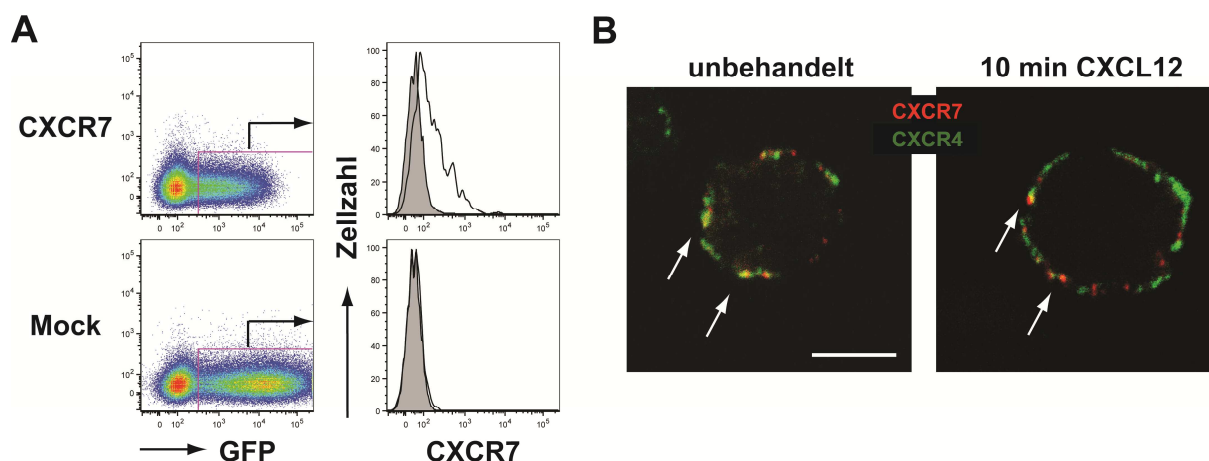


Abb. 24: CXCR7 kolokalisiert mit CXCR4 auf SCB.29 Zellen (A) SCB.29-Zellen wurden mit den Konstrukten pIRES2-EGFP-hCXCR7 bzw. einem EGFP Mock-Kontroll-Plasmid elektroporiert. Am folgenden Tag wurde die Transfektionseffizienz (Anzahl an GFP positiven Zellen) sowie die Oberflächenexpression von CXCR7 unter Verwendung des CXCR7 Antikörpers Klon 8F11-M16 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (B) CXCR7 transfizierte SCB.29-Zellen wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Hierfür wurden die CXCR7 exprimierenden SCB.29-Zellen zunächst für 10 min mit 20 nM CXCL12 stimuliert (rechts) bzw. unstimuliert gelassen (links) und anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CXCR7 (Klon 8F11-M16) und CXCR4 (Klon 2B11) angefärbt. Kolokalisationen von CXCR4 (grün) und CXCR7 (rot) Fluoreszenzsignalen (überlagerte Farbe: gelb) sind durch Pfeile hervorgehoben (Maßstab: 5 µm).

Deutlich war eine Kolokalisation von CXCR7 und CXCR4 Fluoreszenzsignalen im Bereich der Plasmamembran der Zellen zu beobachten, die unabhängig von der Stimulation mit 20 nM CXCL12 war. CXCR7 schien somit Chemokin-unabhängig mit CXCR4 an der Zelloberfläche zu assoziieren.

4.5.2 CXCR7 wirkt kooperativ mit CXCR4 in der Weiterleitung von anti-apoptotischen Signalen *in vitro*

Im nächsten Schritt galt es nun herauszufinden, ob CXCR7 in der Lage war, SCB.29 Zellen einen pro-proliferativen oder anti-apoptotischen Vorteil zu verschaffen. Zur Messung der Proliferationskapazität wurden CXCR7 bzw. Mockkontrolle exprimierende SCB.29-Zellen in Anwesenheit von CXCL12 und des synthetischen Nucleosids BrdU auf CD3-Antikörper beschichteten Platten kultiviert und nach zwei Stunden der Einbau an BrdU in die DNA mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 25). Die Proliferationskapazität CXCR7 bzw. Mock exprimierender SCB.29 Zellen war nach CXCL12 und präTCR-Stimulation für beide Zellpopulationen vergleichbar (Abb. 25-A). Im Gegensatz hierzu hatte CXCR7 einen signifikanten Effekt auf die Apoptose von SCB.29 Zellen (Abb. 25-B). SCB.29 Zellen, die mit 400 Rad bestrahlt worden waren, konnten infolge einer CXCL12 Stimulation und präTCR Aktivierung

durch CD3-Crosslinking vor Apoptose gerettet werden. Darüber hinaus wurde die Apoptoserate noch weiter reduziert, wenn zusätzlich CXCR7 auf den Zellen exprimiert wurde.

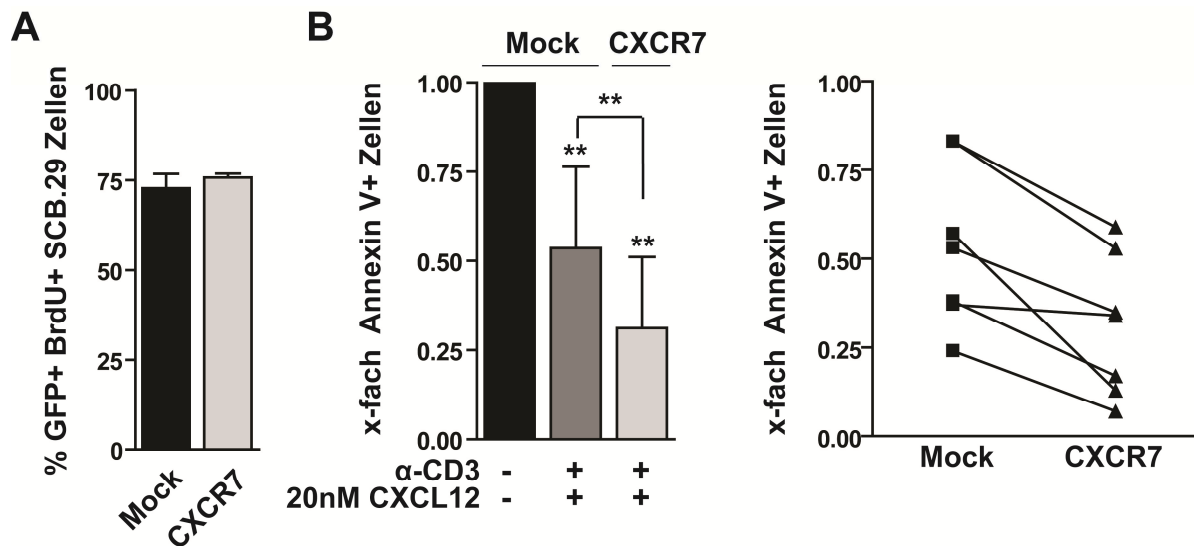


Abb. 25: CXCR7 vermittelt kooperativ mit CXCR4 Überlebenssignale *in vitro* (A) Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden CXCR7 (hellgrauer Balken) bzw. Mock (schwarzer Balken) transfizierte SCB.29 Zellen für zwei Stunden mit 20 nM CXCL12 auf CD3-Antikörper beschichteten Zellkulturplatten in Anwesenheit von 10 μ M BrdU stimuliert. Die Anzahl proliferierender BrdU+GFP+ SCB.29-Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. (B) Um feststellen zu können, ob CXCR7 exprimierende SCB.29 eine erhöhte Apoptoseresistenz aufwiesen, wurden CXCR7 transfizierte Zellen (hellgrauer Balken) bzw. Mock-transfizierte Zellen (schwarzer und grauer Balken) mit 400 Rad bestrahlt und für vier Stunden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 nM CXCL12 bzw. CD3-Antikörpern weiterkultiviert. Anschließend wurde die Apoptoserate durch Färbung der Zellen mit Annexin V mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Annexin V+ Zellen als Vielfaches relativ zum Anteil bestrahlter nicht-stimulierter EGFP+-Mock-Kontrollzellen (willkürlich gleich 1 gesetzt, schwarzer Balken). Für die statistische Auswertung wurde ein gepaarter zweiseitiger T-Test nach Student verwendet. In der rechten Abbildung ist das Ergebnis als Matched-Pair –Analyse für die bestrahlten, CXCL12 und CD3 stimulierten CXCR7-exprimierenden Zellen (Dreiecke) bzw. Mockkontrollzellen (Quadrate) dargestellt. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD (**P \leq 0.01)

Die anti-apoptotische Eigenschaft von CXCR7 wurde auch in einem Caspase-Aktivierungsexperiment bestätigt (Abb. 26). Die Behandlung von CXCL12 und CD3-Antikörper stimulierten SCB.29 Zellen mit dem Proteinkinase Inhibitor Staurosporin führte zur Induktion von Apoptose, welche in Mock-exprimierenden Zellen durch eine deutliche Aktivierung und Spaltung der Caspasen 9 und 3 charakterisiert war. In CXCR7 exprimierenden SCB.29 Zellen war dagegen die Caspase 3 Aktivierung und Spaltung signifikant reduziert. Die Caspase 9 Aktivierung zeigte nur eine moderate Reduzierung in Anwesenheit von CXCR7.

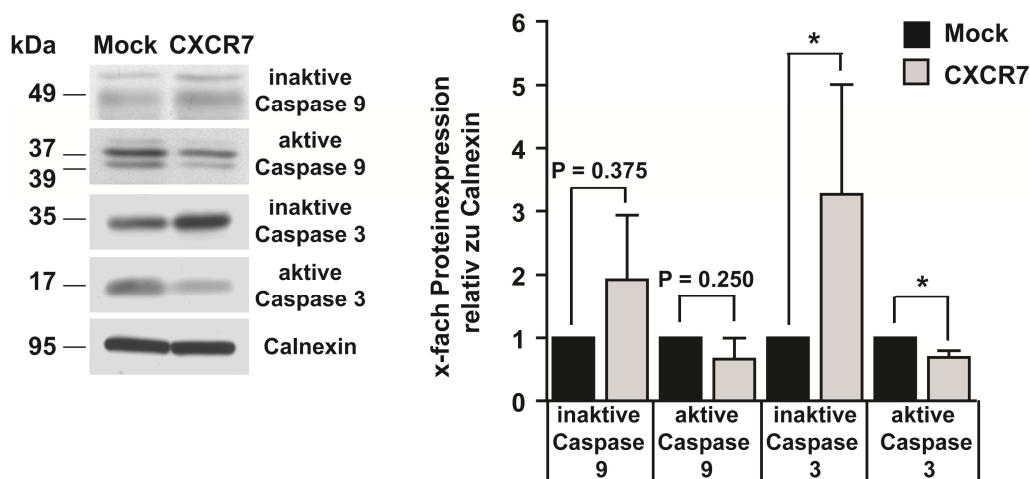


Abb. 26: CXCR7 schützt vor Caspase-induziertem Zelltod *in vitro* CXCR7 bzw. Mock transfizierte SCB.29-Zellen wurden durch FACS-Sortierung aufgereinigt und mit 20 nM CXCL12 auf CD3-Antikörper beschichteten Platten für eine Stunde prästimuliert. Nach Apoptoseinduktion durch Zugabe von 1 μ M Staurosporin wurden die Zellen drei Stunden weiterkultiviert. Anschließend wurden zum Nachweis von aktivierten Caspase-Kaskaden Proteinlysate hergestellt und im Westernblot analysiert. Als Ladekontrolle diente die Expression von Calnexin. Dargestellt ist auf der linken Seite ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten. In der rechten Abbildung wurden zur quantitativen Auswertung die Bandenintensitäten der inaktiven und aktiven Caspase-Formen auf die Calnexinexpression bezogen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SD (* $P \leq 0.05$).

Insgesamt lassen die Experimente in SCB.29 Zellen darauf schließen, dass CXCR7 kooperativ mit CXCR4 Thymozyten vor Apoptose retten kann, jedoch keinen messbaren Einfluss auf die Thymozytenproliferation hat.

4.6 CXCR7 vermittelt Thymozyten Überlebenssignale durch Hochregulierung von anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie

Die beobachtete anti-apoptotische Funktion von CXCR7 in Thymozyten führte zu der Frage, welche anti-apoptotischen Moleküle der Bcl2 Proteinfamilie potentiell in der Vermittlung von CXCR7 Überlebenssignalen involviert sein könnten. Für die präTCR Signaltransduktion ist beschrieben worden, dass während der thymischen β -Selektion der präTCR in DN Thymozyten Überlebenssignale durch die Hochregulation des anti-apoptotischen Moleküls Bcl2-A1d induziert (Mandal *et al.*, 2005). Die Hochregulation von Bcl2-A1d ist dabei kritisch von der Assoziation des präTCR an CXCR4 abhängig (Tramont *et al.*, 2010). Um feststellen zu können, ob CXCR7 zu anti-apoptotischen Eigenschaften des präTCR-CXCR4 Komplexes beiträgt, indem es zusätzlich anti-apoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie induziert, wurden CXCR7 transfizierte SCB.29 Zellen mit CXCL12 und CD3-Antikörper stimuliert. Anschließend wurden CXCR7⁺ und CXCR7⁻ Zellen des Stimulationsexperimentes durch FACS-

Sortierung aufgetrennt und die Expression von Bcl2-Molekülen mittels quantitativer RT-PCR analysiert (Abb. 27).

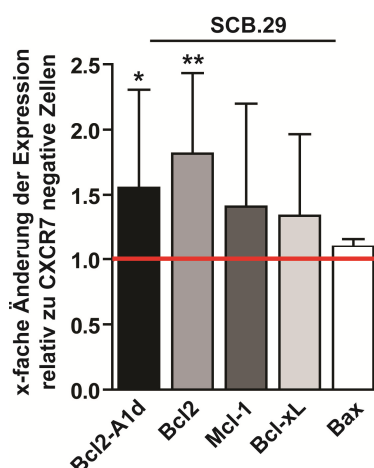


Abb. 27: CXCR7-vermittelte Signalwege in SCB.29-Zellen induzieren anti-apoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie CXCR7 transfizierte SCB.29 Zellen wurden für fünf Stunden mit 20 nM CXCL12 auf CD3-Antikörper beschichteten Zellkulturplatten stimuliert. Anschließend wurden CXCR7⁺ und CXCR7⁻ Zellen der Kultur durch FACS-Sortierung getrennt, die RNA isoliert und für quantitative RT-PCR-Analysen zum Nachweis von Transkripten für murines Bcl2-A1d, Bcl2, Mcl-1, Bcl-xL und Bax verwendet. Die Genexpressionslevel wurden relativ zur GAPDH Expression ermittelt. In der Abbildung sind die Transkriptlevel in CXCR7 exprimierenden Zellen normalisiert zur Genexpression in CXCR7 negativen SCB.29-Zellen dargestellt (willkürlich gleich 1 gesetzt, rote Linie). Zu sehen ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

Die qRT-PCR-Analyse ergab, dass CXCR7 exprimierende SCB.29 Zellen eine signifikante Zunahme in der Expression an Bcl2-A1d mRNA im Vergleich zu CXCR7 negativen Zellen aufwiesen. Gleichzeitig konnte eine signifikante Hochregulation der Bcl2 mRNA in CXCR7 exprimierenden SCB.29 Zellen beobachtet werden.

Desweiteren wurde die Expression von Bcl2-Molekülen in CXCR7 exprimierenden primären Thymozyten mittels qRT-PCR analysiert. Hierfür wurden erneut Kokulturen von OP9-DL1 Stromazellen und CXCR7 bzw. Mock transduzierten Knochenmarkvorläuferzellen durchgeführt und am Tag neun der Kokultur aus aufgereinigten Lin⁻GFP⁺ Thymozytenpopulationen RNA gewonnen (Abb. 28). Die CXCR7-exprimierenden DN Thymozyten aus OP9-DL1 Kokulturen waren ebenfalls durch eine erhöhte, wenn auch nur moderat erhöhte Bcl2-A1d mRNA Expression charakterisiert. Signifikant erhöhte mRNA Expressionslevel konnten dagegen für das Gen Bcl-xL festgestellt werden. Ebenso wie Bcl2 ist auch Bcl-xL als eine anti-apoptotische Genfunktion beschrieben worden, die physiologisch nicht durch die präTCR-CXCR4 Signaltransduktion in DN Thymozyten induziert wird (Mandal *et al.*, 2005).

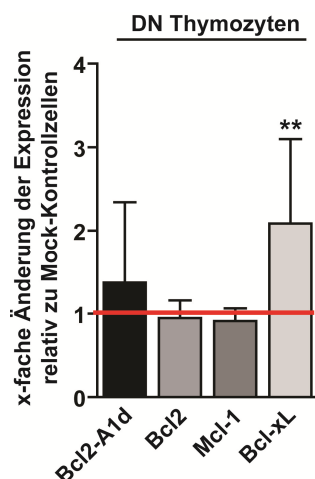


Abb. 28: CXCR7-induzierte Signalwege verstärken die Expression von anti-apoptotischen Bcl2-Molekülen in primären Thymozyten CXCR7 bzw. Mock-Kontrolle exprimierende Thymozyten von OP9-DL1 Kokulturen wurden am Tag 9 der Kokultur geerntet. Linien-negative (Lin-) GFP⁺ Thymozyten wurden durch FACS-Sortierung aufgereinigt und deren RNA isoliert. Diese wurde für quantitative RT-PCR Analysen verwendet, in denen die Genexpression von murinem Bcl2-A1d, Bcl2, Mcl-1 und Bcl-xL bestimmt wurde. Die Genexpression wurde relativ zur GAPDH Expression ermittelt und die Expression in CXCR7 exprimierenden DN Thymozyten auf die Transkriptlevel in Mock-exprimierenden DN Thymozyten (willkürlich gleich 1 gesetzt, rote Linie) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD als Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (** $P \leq 0.01$).

Zusammenfassend ergeben die Daten, dass konstitutiv exprimiertes CXCR7 in DN Thymozyten die Funktion eines zusätzlichen Ko-Aktivators während der thymischen β -Selektion durch Verstärkung der präTCR-CXCR4 induzierten Expression von Bcl2-A1d ausübt. Darüber hinaus scheint CXCR7 in der Lage zu sein, weitere anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie zu induzieren und somit CXCR7 exprimierenden DN Thymozyten Überlebensvorteile zu verschaffen.

4.7 Generierung einer konditionellen CXCR7 defizienten Maus

Um mehr über physiologische Funktionen von CXCR7 im hämatopoetischen System erfahren zu können, wurde in der Arbeit neben dem Ansatz der retroviralen Überexpression auch der alternative Ansatz der genetischen Deletion des Rezeptors durch Generierung einer konditionellen KO-Maus gewählt. Für die Generierung des CXCR7-KO-Mausmodells sollte das Cre/loxP-Rekombinationssystem verwendet werden. Der konditionelle Ansatz wurde gewählt, da die vollständige Deletion von CXCR7 als embryonal letal angenommen wurde. Außerdem ermöglicht eine induzierte gewebsspezifische Expression der Cre-Rekombinase eine gezielte Deletion von CXCR7 in gewünschten hämatopoetischen Zellpopulationen.

4.7.1 Identifizierung der genomischen CXCR7-Sequenz

Ausgehend von der genomischen Sequenz von BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Klonen, die den CXCR7-Lokus enthielten, wurde das CXCR7-*Targeting* Konstrukt generiert. Hierfür wurde zunächst die CXCR7-Sequenz in drei verschiedenen BAC-Klonen einer C57BL/6 Genombibliothek (*Children's Hospital Oakland Research Institute*, CHORI) mit Hilfe einer 400 bp cDNA-Sonde verifiziert, die innerhalb der CXCR7-cDNA Sequenz bindet (Abb. 29).

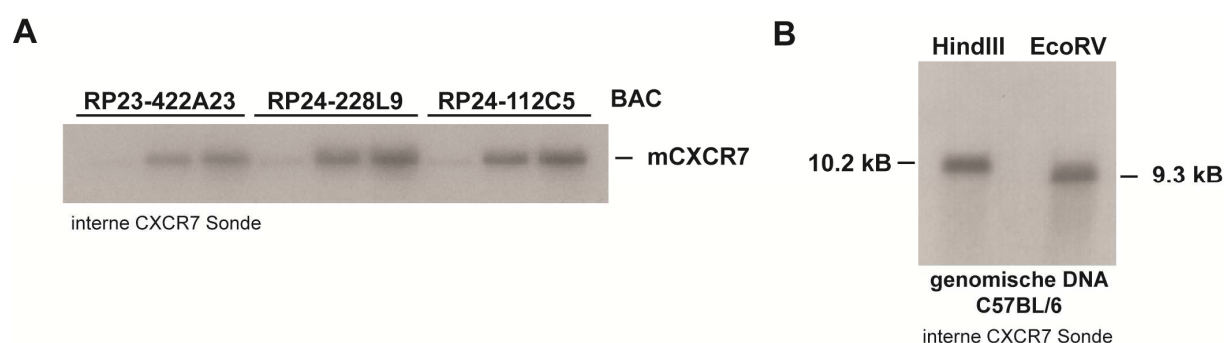


Abb. 29: Southernblot-Analyse der BAC-Klone A23, L9 und C5 sowie genomischer C57BL/6 Mause-DNA (A) Southern-Hybridisierung von *Sma*I-verdauter Plasmid-DNA der BAC-Klone RP23-422A23, RP24-228L9 und RP24-112C5 unter Verwendung der internen murinen CXCR7-cDNA Sonde. Für jeden Klon wurden drei verschiedene Plasmid-Mengen (0.5, 5 und 18 µg) aufgetragen. (B) Southern-Hybridisierung von *Hind*III bzw. *Eco*RV-verdauter genomischer DNA aus Wt C57BL/6 Mäusen unter Verwendung der internen CXCR7 cDNA-Sonde.

Mittels Southern-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass alle drei BAC-Klone die gewünschte CXCR7-Sequenz enthielten (Abb. 29-A). Zusätzlich wurde die cDNA-Sonde zum Nachweis der Sequenz in genomischer DNA aus C57BL/6-Mäusen verwendet (Abb. 29-B). Die Southern-Hybridisierung ergab die erwarteten Bandengrößen von 10.2 kB nach *Hind*III und 9.3 kB nach *Eco*RV-Restriktionsverdau der DNA.

4.7.2 Generierung eines konditionellen CXCR7-*Targeting*-Konstrukts

Für die Generierung des konditionellen CXCR7-*Targeting* Vektors wurde ausgehend von der genomischen Sequenz des BAC-Klons RP24-112C5 eine genomische Region von ~ 12.5 kB, in den Vektor pDTA durch homologe Rekombination subkloniert (Abb. 30).

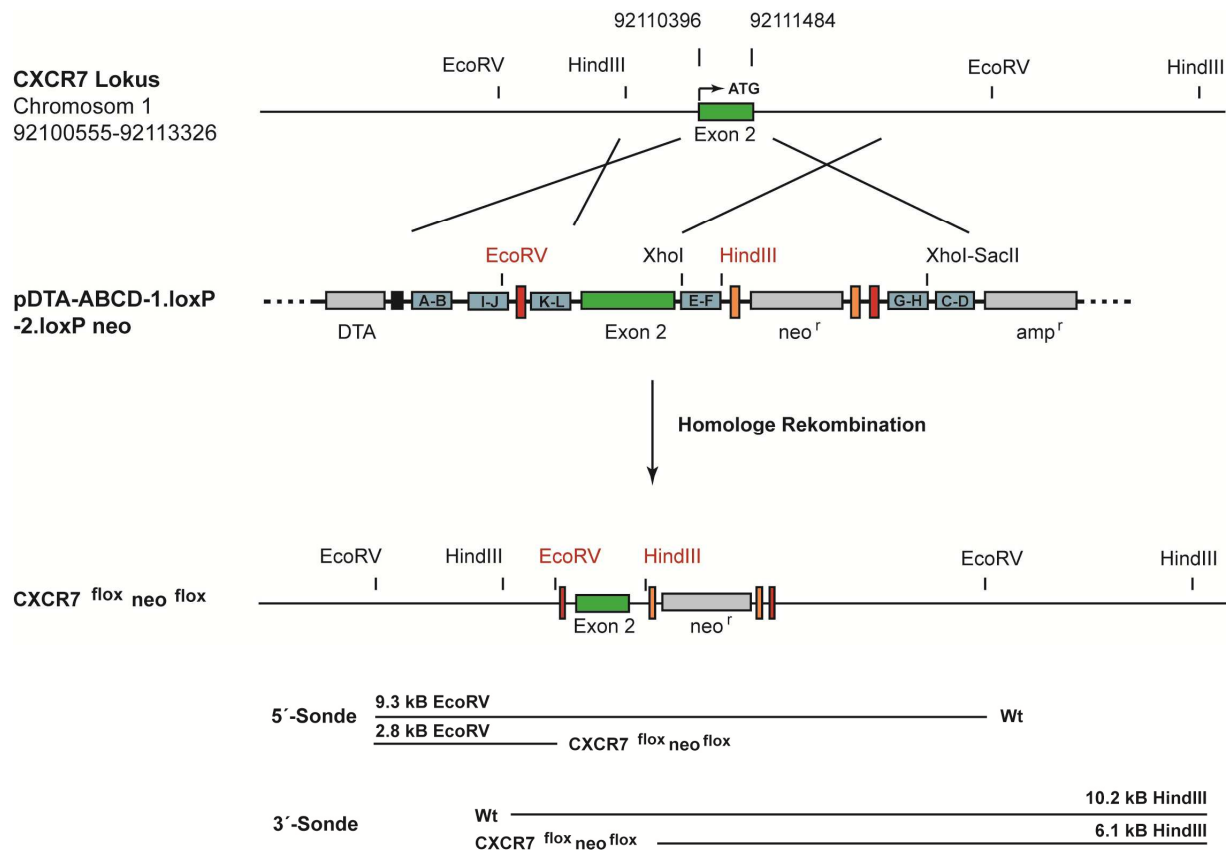


Abb. 30: Strategie zur konditionellen Deletion von CXCR7 Schematische Darstellung des murinen Wt CXCR7 Lokus auf Chromosom 1, des CXCR7-Targeting-Konstrukts (pDTA-ABCD-1.loxP-2.loxP-neo) und des mutierten CXCR7-Allels nach erfolgter homologer Rekombination (CXCR7^{flox}neo^{flox}). Die Exons sind als graue Boxen (Ausnahme CXCR7 Exon 2: grüne Box), die Homologiearme als blau-graue Boxen und die Introns als schwarze Linien dargestellt. Die loxP Sequenzen sind durch rote Boxen symbolisiert, die FRT-Sequenzen durch orangene Boxen. Die nach Restriktionsspaltung zu erwartenden Fragmentgrößen im Southern-Blot unter Verwendung der 5' bzw. 3' Sonde sind unten eingezeichnet. Die neuen, durch den Rekombinationsvektor eingeführten Schnittstellen, sind in roter Schrift hervorgehoben.

Das 12.5 kB Fragment enthielt das *Exon 2* von CXCR7, welches den gesamten ORF von CXCR7 codiert. Anschließend wurde ein Neomycinresistenzgen, welches von zwei *FRT* und zwei *loxP* Sequenzen flankiert war, stromaufwärts vom *Exon 2* eingeführt. Durch Expression einer Cre-Rekombinase wurden beide *loxP*-Sequenzen zu einer *loxP* Sequenz 5' von *Exon 2* fusioniert. Im letzten Schritt wurde eine zweite *loxP*-Sequenz stromabwärts des *Exon 2* integriert. Diese war mit einem Neomycinresistenzgen assoziiert, welches durch zwei *FRT*-Sequenzen flankiert war. Mit den beiden *loxP*-Sequenzen wurden eine künstliche *EcoRV* und *HindIII* Restriktionsschnittstelle in das Konstrukt eingefügt. Eine detaillierte Beschreibung zur Klonierung findet sich in Kap. 3.1.16.2.

4.7.3 Homologe Rekombination des konditionellen CXCR7-Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen

Der Rekombinationsvektor wurde durch *PacI*-Restriktionsverdau linearisiert und in ES-Zellen von C57BL/6 Mäusen elektroporiert. 800 ES-Zellklone konnten anschließend durch G418-Selektion angereichert und isoliert werden. Zur Identifizierung von ES-Zellklonen mit homologer Rekombination wurde die genomische DNA der ES-Zellen mit *EcoRV* verdaut und unter Verwendung einer 5'-Sonde im Southernblot analysiert. Als 5'-Sonde diente eine 700 bp Sequenz, die stromaufwärts des rekombinierten Vektors bindet. Mit Hilfe dieser Sonde konnten neun ES-Zellklone identifiziert werden, die neben der Bande des Wt Allels bei 9.3 kB eine Bande des rekombinierten Allels bei 2.8 kB aufwiesen. Diese neun Klone wurden in Kultur expandiert und im Southernblot erneut verifiziert. Um sicherzustellen, dass auch der 3' Rekombinationsarm korrekt rekombiniert war, wurde diesmal zusätzlich eine 3'-Sonde, die stromabwärts des Rekombinationsvektors bindet, in die Analyse von *HindIII* verdauter ES-Zell-DNA mit einbezogen (Abb. 31).

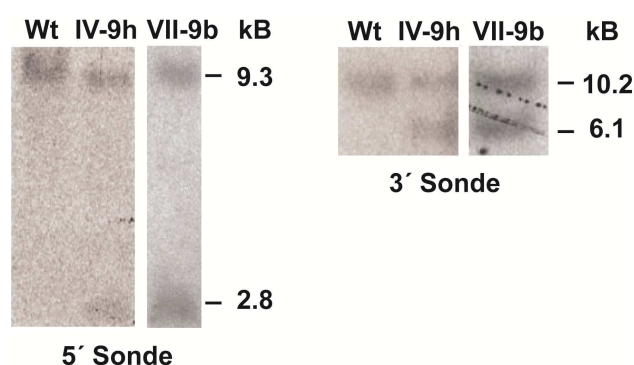


Abb. 31: Southernblot-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone Genomische DNA aus isolierten ES-Zellklonen wurde nach Restriktionsspaltung mit *EcoRV* (für die 5'-Sonde) bzw. *HindIII* (für die 3'-Sonde) im Southernblot analysiert. Für die Klone IV-9h und VII-9b wurden die erwarteten Fragmentgrößen mit 9.3 kB für das Wt-Allel und 2.8 kB für das rekombinierte CXCR7-Allel unter Verwendung der 5'-Sonde bzw. das 10.2 kB Wt-Allel und 6.1 kB rekombierte Allel unter Verwendung der 3'-Sonde erhalten.

Mit Hilfe dieser beiden Sonden konnten zwei ES-Zellklone identifiziert werden, die eine korrekte Rekombination beider Rekombinationsarme aufwiesen. So waren für die ES-Zellklone IV-9h und VII-9b neben den Banden des Wt-Allels bei 9.3 kB (5'-Sonde) bzw. 10.2 kB (3'-Sonde) Banden des rekombinierten Allels bei 2.8 kB (5'-Sonde) bzw. 6.1 kB (3'-Sonde) im Southernblot zu detektieren.

4.7.4 Generierung der konditionellen CXCR7-defizienten Mäuse

Die beiden für das gefloxt *CXCR7*-Gen heterozygoten (+/-) ES-Zellklone IV-9h und VII-9b wurden in Blastozysten des Mausstammes C57BL/6 injiziert und in den Uterus pseudoschwangerer CB6F1 Weibchen transplantiert. Die Jungtiere dieser Mäuse wurden mittels PCR-Analyse auf chimäre Nachkommen gescreent. Hierfür wurden PCR-Analysen auf genomischer Schwanz-DNA durchgeführt, in denen das Neomycinresistenzgen und die beiden *loxP*-Sequenzen detektiert wurden (Abb. 32-A).

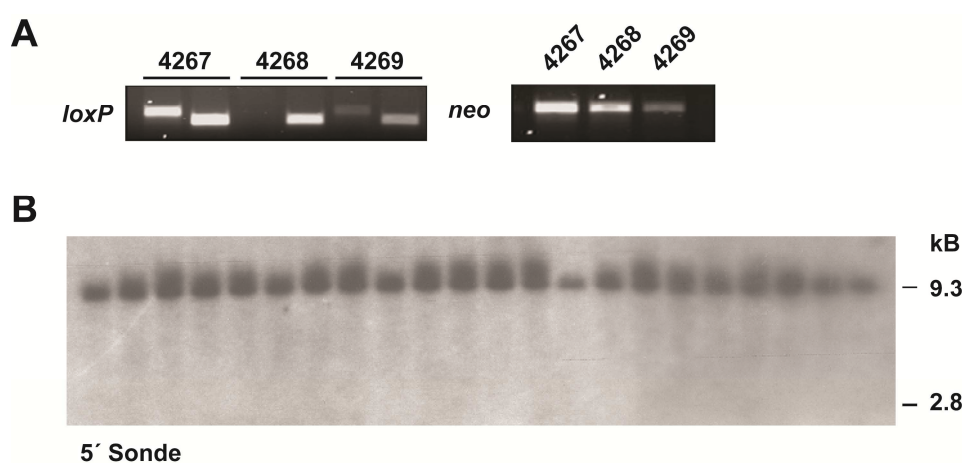


Abb. 32: PCR-Analyse chimärer *CXCR7^{lox}neo^{lox}*-Mäuse und Southernblotanalyse der Keimbahnweitergabe (A) PCR-Analyse genomischer DNA aus heterozygoten *CXCR7^{lox}neo^{lox}* chimären Nachkommen. Es wurden sequenzspezifische Primer zur Detektion der beiden *loxP* Sequenzen (links) und des Neomycin-Gens (rechts) verwendet. (B) Southern-Hybridisierung EcoRV-verdauter genomischer DNA der C57BL/6 Nachkommen von heterozygoten *CXCR7^{lox}neo^{lox}* chimären Mäusen. Neo, Neomycin.

Mit Hilfe der PCR-Analysen konnten insgesamt 16 chimäre Nachkommen identifiziert werden, die anschließend mit Wt C57BL/6 Mäusen verpaart wurden. Die Weitergabe des gefloxt *CXCR7*-Allels in die Keimbahn wurde erneut mittels Southernblot unter Verwendung der 5'-Sonde analysiert. Unter 300 Nachkommen der *CXCR7* chimären Mäuse wies jedoch keine Maus die erwartete Bande des mutierten Allels bei 2.8 kB auf (Abb. 32-B). Die mutierten ES-Zellen waren scheinbar nicht in der Lage, zur Keimbahntransmission beizutragen, welche entscheidend für die Etablierung der *CXCR7*-defizienten Mauslinie gewesen wäre. Die Generierung der konditionellen *CXCR7* *Knockout*-Maus wurde daher nicht weiterverfolgt, insbesondere da unabhängig von dieser Arbeit ein konditionelles *CXCR7* KO-Mausmodell publiziert wurde (Sierro *et al.*, 2007).

Analyse CCR7 vermittelter Mechanismen der E μ -Myc Lymphomzelldissemination in sekundäre lymphatische Organe

4.8 E μ -Myc-Lymphomzellen besitzen ein spezifisches Expressionsprofil an Chemokin- und Adhäsionsrezeptoren

Um Mechanismen der Dissemination von B-Lymphomzellen näher charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das transgene E μ -Myc Mausmodell verwendet. E μ -Myc transgene Mäuse entwickeln spontan B-Zelllymphome, welche durch stark vergrößerte Lymphknoten und Milzen, häufig assoziiert mit der Entwicklung einer Leukämie, gekennzeichnet sind (Baudino et al., 2003; Maclean et al., 2008; Reimann et al., 2010; Ruddell et al., 2003). Um potentielle Regulatoren der Lymphomzelldissemination identifizieren zu können, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits ein Expressionsprofil an hämöostatischen Chemokinrezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen für verschiedene E μ -Myc-Zellklone aus erkrankten transgenen Tieren mittels Durchflusszytometrie erstellt worden. Hierbei wurden Moleküle ausgewählt, welche physiologisch in der lymphatischen Neogenese und Aufrechterhaltung der Lymphknotenarchitektur eine Rolle spielen. Diese wurden angenommen, für die Einwanderung von Lymphomzellen in sekundäre lymphatische Organe (SLO) von Bedeutung zu sein (Abb. 33).

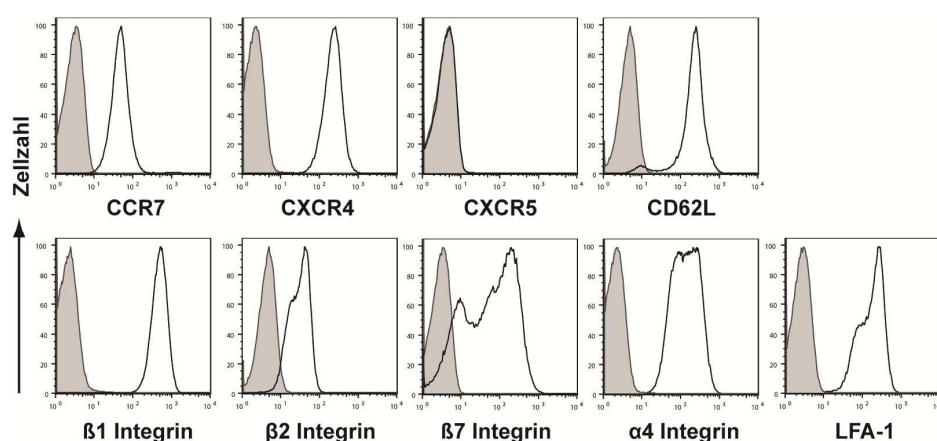


Abb. 33: Chemokinrezeptor- und Adhäsionsmolekül-Expressionsprofil von E μ -Myc-Lymphomzellen
Die Oberflächenexpression verschiedener hämöostatischer Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle auf E μ -Myc-Lymphomzellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Tumorzellen wurden aus Lymphknoten Lymphom-erkrankter E μ -Myc transgener Tiere isoliert und im FACS anhand der Expression des B-Zell-Markers B220 identifiziert. Pro Oberflächenmarker wurden vier bis sieben Mäuse analysiert (Isotype-Kontrolle, graue Kurven).

Es konnte für insgesamt sieben verschiedene getestete E μ -Myc-Zellklone eine hohe Oberflächenexpression des homöostatischen Chemokinrezeptors CXCR4 und eine intermediäre Expression für CCR7 festgestellt werden. Der Chemokinrezeptor CXCR5, welcher physiologisch auf allen reifen B-Lymphozyten exprimiert wird, war hingegen auf keinem der getesteten Klone nachweisbar (obere Reihe). Der Pro- und Prä-B-Zellphänotyp der E μ -Myc-Zellen war durch eine B220⁺/I-A^{b+}/CD127⁺/CD117⁻/prä-BCR⁻/IgD⁻/LT β -R⁻ Oberflächenexpression charakterisiert. Die IgM-Expression, ein Marker für naive B-Zellen, variierte zwischen den einzelnen Klonen.

Desweiteren konnte auf allen getesteten E μ -Myc-Zellklonen eine hohe Expression an β 1, β 2, β 7, α 4 und α 4 β 2 (LFA-1) Integrinen detektiert werden, welche auch auf reifen B-Zellen in SLOs exprimiert vorliegen (untere Reihe). Lediglich die Expressionshöhe von L-Selektin (CD62L), welches für die Adhäsion von Lymphozyten an hochendotheliale Venolen benötigt wird, variierte zwischen den Klonen.

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass E μ -Myc-B-Lymphomzellen mit zwei wichtigen *Homing*-Chemokinrezeptoren, CXCR4 und CCR7, sowie zahlreichen Integrinen ausgestattet sind, welche sie für die Einwanderung in SLOs qualifiziert.

4.9 CCR7 reguliert die Migration von E μ -Myc-Lymphomzellen und Lymphompathogenese *in vivo*

4.9.1 CCR7 trägt entscheidend zur Lymphompathogenese von E μ -Myc-Lymphomen bei

In zahlreichen klinischen Studien wurde eine Korrelation zwischen der CCR7-Expression in B-Zell-Lymphomen und deren Lokalisation in SLOs festgestellt (Hopken et al., 2002; Lopez-Giral et al., 2004; Till et al., 2002). Es fehlte jedoch bislang ein *in vivo* Mausmodell, welches diese biologische Situation reflektiert. In der Arbeitsgruppe wurde daher ein neues Lymphommodell etabliert, in dem CCR7^{-/-} Mäuse mit E μ -Myc transgenen Mäusen gekreuzt wurden. Diese CCR7^{-/-}E μ -Myc doppelt transgenen Mäuse waren im Vergleich zu Wt E μ -Myc-transgenen Mäusen durch eine verzögerte Lymphomentwicklung charakterisiert. Im Durchschnitt entwickelten Wt-E μ -Myc transgene Mäuse eine schwere Lymphomerkrankung zehn Wochen nach der Geburt (10 ± 4.8 Wochen; $n = 10$ Mäuse), wohingegen CCR7^{-/-} E μ -Myc doppelt transgene Mäuse erst mehr als fünf Wochen später (16.4 ± 5.6 Wochen, $n = 12$ Mäuse;

****P ≤ 0.01)** erkrankten. Zum exakteren Vergleich der Kinetik des Lymphomwachstums wurden Lymphomzellen aus den Lymphknoten erkrankter Wt oder CCR7^{-/-} Eμ-Myc transgener Mäuse in kongene Empfänger-mäuse *i.v.* transferiert (Abb. 34).

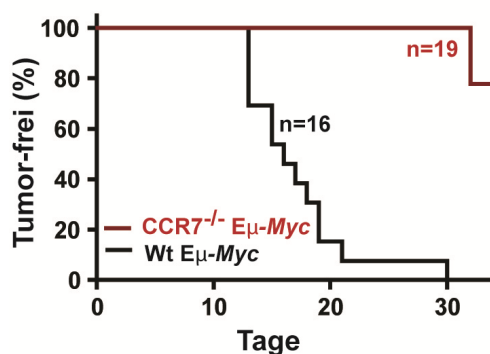


Abb. 34: Verzögertes Lymphomwachstum in CCR7^{-/-}-Eμ-Myc-Transfermäusen Kongenen Empfänger-mäusen wurden 1x10⁵ Tumorzellen aus Wt oder CCR7^{-/-}-Eμ-Myc transgenen Tieren *i.v.* injiziert und die Zeit bis zum Eintreten von Erkrankungsanzeichen (vergrößerte, tastbare Lymphknoten) bestimmt. Die abgebildeten Überlebenskurven repräsentieren die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Experimenten mit je n = 5-8 Mäusen pro Gruppe und Experiment (***** P ≤ 0.001**).

Empfängermäuse von Wt Eμ-Myc-Lymphomzellen (n = 16) wiesen einen vergleichbaren Krankheitsverlauf auf, der durch tastbare Lymphknoten am Tag 10-14 und der Entwicklung einer schweren Lymphomerkrankung am Tag 18-21 charakterisiert war. Empfängermäuse von CCR7^{-/-} Eμ-Myc Lymphomzellen (n = 19) hingegen erkrankten erst deutlich verzögert. Am Tag 21 nach Transfer waren keine vergrößerten Lymphknoten ertastbar und die Mäuse blieben bis mehr als 35 Tage nach Transfer klinisch gesund. Nach diesem Zeitpunkt wurden die Tiere abgetötet. CCR7 scheint somit kritisch in die Lymphompathogenese im Eμ-Myc Mausmodell involviert zu sein.

4.9.2 CCR7 vermittelt die Migration von Eμ-Myc-Lymphomzellen in sekundäre lymphatische Organe (SLOs)

CCR7 vermittelt die Einwanderung von rezirkulierenden naiven B und T Lymphozyten aus dem Blut in sekundäre lymphatische Organe. In diesen Organen erfahren die Lymphozyten Wechselwirkungen mit umgebenden Stromazellen, welche entscheidend zu ihrem Überleben und ihrer Expansion beitragen. Man nimmt an, dass diese Wechselwirkungen auch die Lymphompathogenese in SLOs begünstigen, da *ex vivo* primäre Lymphomzellen in der Regel hoch apoptotisch und dadurch schwer zu kultivieren sind. Die verzögerte Lymphompathogenese in CCR7^{-/-} Eμ-Myc transgenen Mäusen ließ vermuten, dass CCR7 defiziente Lymphom-

zellen in der Fähigkeit eingeschränkt sind, in SLOs und somit in eine putativ wachstumsstimulierende Umgebung einzuwandern. Zur Bestimmung der Einwanderungsfähigkeit in SLOs wurden Wt und CCR7^{-/-} Eμ-Myc-Lymphomzellen in kongene Mäuse transferiert und deren Infiltrationsgrad in lymphatische Organe mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 35).

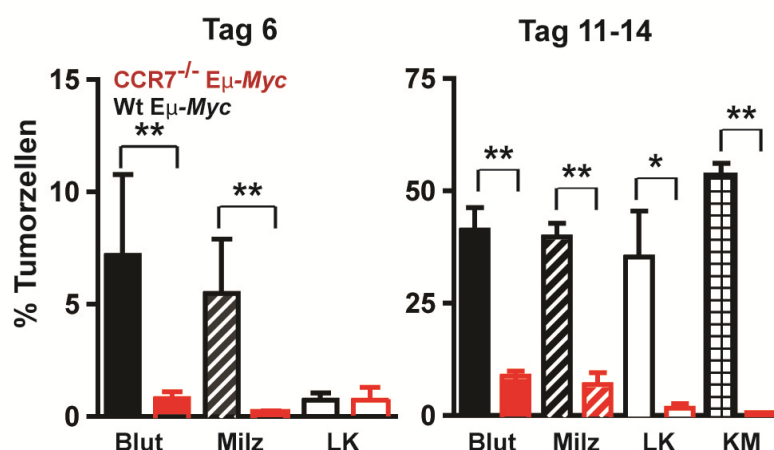


Abb. 35: Infiltration von Wt und CCR7^{-/-} Eμ-Myc-Zellen in lymphatische Organe Der Infiltrationsgrad an Wt (schwarze Balken) und CCR7^{-/-} (rote Balken) Eμ-Myc-Lymphomzellen in peripherem Blut, in der Milz, und in Lymphknoten wurde sechs bzw. 11-14 Tage nach dem i.v. Transfer der Tumorzellen in kongene Empfänger-mäuse mittels Durchflusszytometrie analysiert. An den Tagen 11-14 nach Transfer wurde zusätzlich die Menge an eingewanderten Tumorzellen im Knochenmark bestimmt. Die transferierten Tumorzellen wurden im FACS als B220⁺/CD45.2⁺ doppelt-positive Zellen identifiziert. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD mit n = 4 Mäusen pro Experiment für Tag 6 bzw. n = 5-14 Mäusen (Blut, Milz, Lymphknoten) und n = 3-5 Mäusen (Knochenmark) pro Experiment für Tag 11-14 (* P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01).

Während Wt Eμ-Myc-Lymphomzellen am Tag 6 und an den Tagen 11-14 nach Transfer in Blut, Milz, Lymphknoten und Knochenmark klar nachgewiesen werden konnten, waren CCR7 defiziente Lymphomzellen am Tag 6 in diesen Organen kaum detektierbar. Am Tag 11-14 nach Transfer waren vermehrt CCR7^{-/-} Lymphomzellen in Blut und Milz aufzufinden, jedoch in stark verringerten Zellzahlen im Vergleich zu Wt Eμ-Myc-Lymphomzellen. In Lymphknoten und Knochenmark waren auch am Tag 11-14 nahezu keine CCR7 defizienten Tumorzellen nachweisbar.

Insgesamt kann daraus geschlossen werden, dass CCR7 defiziente Lymphomzellen nur erschwert aus dem Blut in lymphatische Organe einwandern können. Sie gelangen somit nicht in die wachstumsfördernde Mikroumgebung lymphatischer Organe und gehen vermutlich in der roten Pulpa der Milz unter. Zusätzlich wird deren Einwanderung in Lymphknoten durch die variable Expression von L-Selektin erschwert.

4.9.3 Die Positionierung von E μ -Myc-Lymphomzellen in der T-Zellzone lymphatischer Follikel ist CCR7-abhängig

Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation von Wt und CCR7 defizienten E μ -Myc-Lymphomzellen in sekundären lymphatischen Organen zu Beginn der Lymphomerkkrankung wurden Wt und CCR7^{-/-} E μ -Myc-Zellen in kongene Empfängermäuse transferiert und 6 bzw. 10 Tage nach Transfer deren Milzen und Lymphknoten mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 36).

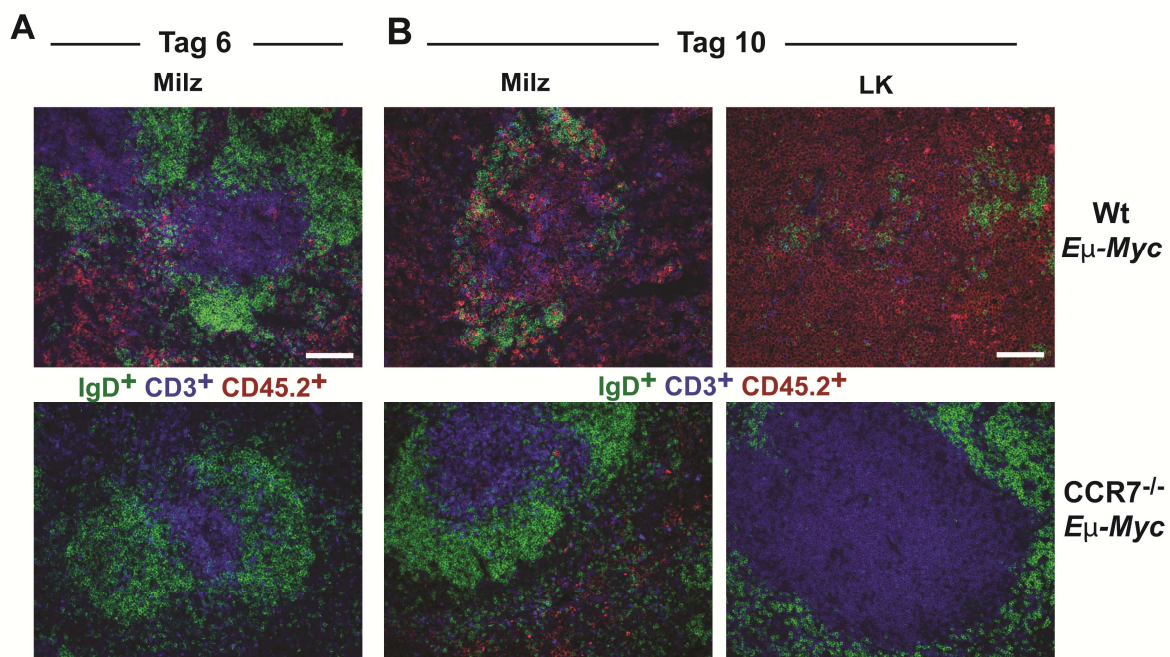


Abb. 36: Unterschiedliche Lokalisationspräferenzen von Wt und CCR7-defizienten Lymphomzellen in sekundären lymphatischen Organen Die Lokalisation von Wt (obere Reihe) und CCR7^{-/-} (untere Reihe) E μ -Myc-Lymphomzellen nach Lymphomzelltransfer in kongene Empfängermäuse wurde am Tag sechs in der Milz (A) und am Tag zehn in Milz und Lymphknoten (B) mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Gefrierschnitte wurden für CD45.2⁺ Tumorzellen (rot), CD3⁺ T-Zellen (blau) und IgD⁺ B-Zellen (grün) mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt (Maßstab: 100 μ m).

Wt E μ -Myc-Lymphomzellen waren am Tag 6 nach Transfer überwiegend in der roten Pulpa der Milz lokalisiert, welche die Follikel der weißen Pulpa umgibt. Zusätzlich konnten zahlreiche Tumorzellen spezifisch in der follikulären T-Zellzone nachgewiesen werden, wohingegen die B-Zellzone weitgehend frei von Tumorzellen war (Abb. 36-A). Am Tag 10 nach Transfer waren die Wt E μ -Myc-Zellen sowohl in T-, als auch B-Zellzonen von Milz und Lymphknoten infiltriert. Die T-Zellzone wies jedoch im Vergleich zur B-Zellzone bereits eine wesentlich stärkere Zerstörung der Mikroarchitektur auf (Abb. 36-B). Anders verhielt sich das Bild für

CCR7 defiziente Lymphomzellen. Am Tag 6 nach Transfer waren in der Milz noch keine Tumorzellen nachweisbar (Abb. 36-A). Erst am Tag 10 konnten CCR7^{-/-}-Tumorzellen in der roten Pulpa detektiert werden, wenn auch in deutlich geringerer Anzahl im Vergleich zu Wt Eμ-Myc Lymphomzellen am Tag 6. Die T-Zellzone in Follikeln von Milz und Lymphknoten war frei von Tumorzellen und deren Struktur noch völlig intakt (Abb. 36-B).

Insgesamt konnte aus den Daten geschlossen werden, dass CCR7 essentiell die Rekrutierung von Lymphomzellen in die T-Zellzone von SLOs über die dort exprimierten Liganden CCL19 und CCL21 vermittelt.

4.10 CCR7 vermittelt Eμ-Myc-Lymphomzellen den Zugang zu Überlebenssignalen *in vivo*

4.10.1 Die CCR7-abhängige Positionierung in lymphatischen Follikeln verschafft Eμ-Myc-Lymphomzellen Überlebensvorteile

Die verzögerte Lymphomentwicklung in Empfänger-mäusen von CCR7 defizienten Lymphomzellen ließ vermuten, dass CCR7^{-/-} Eμ-Myc-Zellen Überlebenssignale fehlen, die sie in der lokalen Mikroumgebung der T-Zellzone erhalten würden. Um dies zu überprüfen wurde die Apoptoserate von Wt und CCR7^{-/-} Lymphomzellen aus Milzen von Eμ-Myc-Transfermäusen am Tag 6 und 15 nach Transfer mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 37).

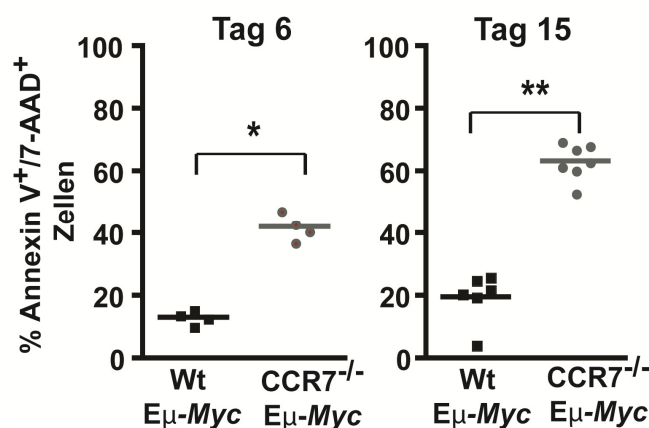


Abb. 37: Erhöhte Apoptoserate in CCR7 defizienten Lymphomzellen Kongenen Empfänger-mäusen wurden 1x10⁵ Lymphomzellen aus Wt oder CCR7-defizienten Eμ-Myc-Mäusen transferriert. 6 bzw. 15 Tage nach Transfer wurde die Apoptoserate der Tumorzellen in der Milz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die B220⁺/CD45.2⁺ doppelt positiven Tumorzellen mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt. Die Abbildung zeigt den Anteil an spätapoptotischen Annexin-V⁺/7-AAD⁺ doppelt-positiven Lymphomzellen (n = 4 Mäuse pro Gruppe für Tag 6 und n = 6-7 Mäuse pro Gruppe für Tag 15; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01).

Es ergab sich, dass CCR7 defiziente Lymphomzellen einen signifikant erhöhten Anteil an spätapoptotischen (Annexin V⁺/ 7AAD⁺) Zellen im Vergleich zu Wt Lymphomzellen aufwiesen. Während für Wt-E μ -Myc Zellen am Tag sechs nur 13.6 ± 2.2 % bzw. am Tag fünfzehn nur 19.63 ± 7.9 % apoptotische Tumorzellen bestimmt werden konnten, betrugen die Apoptoseraten für CCR7^{-/-} Lymphomzellen 42.02 ± 4.3 % am Tag 6 und 63.27 ± 5.7 % am Tag 15. Die Lokalisation von CCR7 defizienten E μ -Myc-Lymphomzellen außerhalb der T-Zellzone schien somit zum verstärkten Absterben der Lymphomzellen und folglich zur verzögerten Lymphomprogression in SLOs zu führen.

4.10.2 CCR7 induziert anti-apoptotische Signaltransduktionswege in E μ -Myc-Lymphomzellen

Es stellte sich nun die Frage, welche Überlebenssignale Wt-E μ -Myc Zellen in der lokalen Umgebung der follikulären T-Zellzone von SLOs erhalten. Für Plattenepithelkarzinome der Kopf-/ Halsregion konnte gezeigt werden, dass CCR7 in der Lage ist, infolge einer autokrinen Stimulation Überlebenssignale durch Aktivierung der PKB/ Akt-Signaltransduktion in den Tumorzellen zu induzieren (Wang *et al.*, 2008). CCL19 und CCL21, welche von Stromazellen in der T-Zellzone exprimiert werden, könnten daher in ähnlicher Weise über CCR7 Überlebenssignalwege in E μ -Myc-Zellen induzieren. Zur Überprüfung einer CCR7-abhängigen Aktivierung von Akt-Signalwegen in E μ -Myc-Zellen wurden Wt und CCR7^{-/-} Lymphomzellen mit rekombinantem CCL19 bzw. CCL21 *in vitro* stimuliert und die Phosphorylierung der Akt-Kinase im Westernblot analysiert (Abb. 38). Während in Wt E μ -Myc Lymphomzellen eine zeitabhängige Zunahme in der Akt-Phosphorylierung infolge der CCL19 bzw. CCL21 Stimulation detektierbar war, blieben die Level an phosphoryliertem Akt Protein in CCR7 defizienten Lymphomzellen über die Zeit konstant. Gleiches traf für aufgereinigte B-Lymphozyten aus Milzen von Wt und CCR7 defizienten Mäusen zu. In Wt B-Zellen war eine zeitabhängige Zunahme der Akt-Phosphorylierung beobachtbar, in CCR7^{-/-} B-Zellen hingegen nicht.

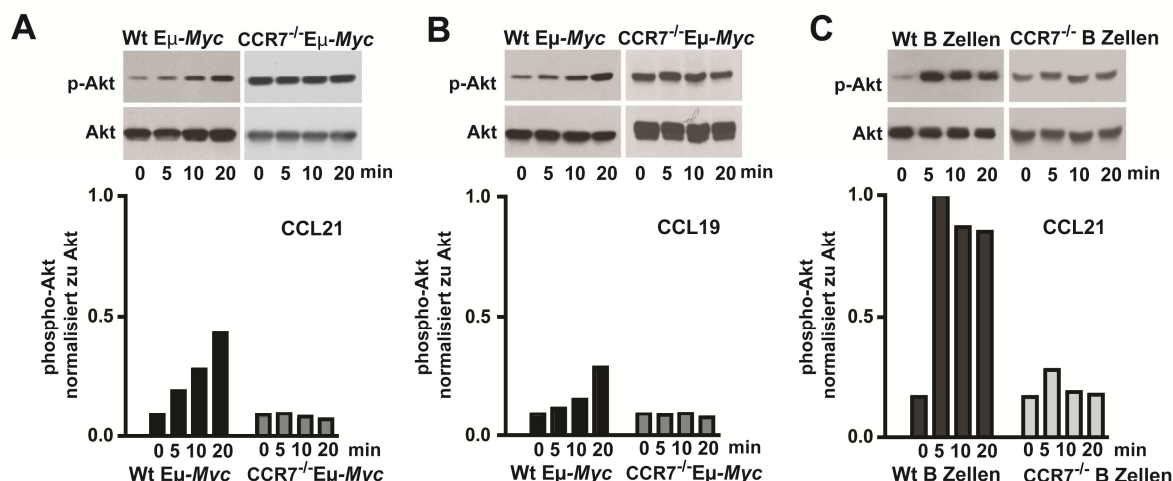


Abb. 38: CCR7-Stimulation aktiviert Akt-Signaltransduktion in Eμ-Myc-Lymphom- und B-Zellen
 Frisch isolierte Wt oder CCR7^{-/-}-Lymphomzellen aus Eμ-Myc-transgenen Mäusen wurden mit 500 ng/ ml rekombinantem CCL21 (A) bzw. CCL19 (B) für 0, 5, 10 und 20 Minuten stimuliert. Zusätzlich wurden B-Lymphozyten aus Milzen von Wt oder CCR7 defizienten Mäusen isoliert und mit CCL21 entsprechend stimuliert (C). Die Zelllysate der stimulierten Zellen wurden anschließend im Westernblot auf eine Aktivierungs-induzierte Phosphorylierung der Akt-Kinase (p-Akt) analysiert. Zur Quantifizierung wurde die Menge an phosphoryliertem Akt-Protein auf die Menge des gesamten Akt-Proteins (Akt) bezogen (untere Reihe). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 13 (Wt Eμ-Myc-Lymphomzellen), 4 (CCR7^{-/-}Eμ-Myc-Lymphomzellen) bzw. 2-4 (Wt und CCR7^{-/-} B Zellen) unabhängigen Experimenten.

Ein weiterer Überlebenssignalweg, der in zahlreichen humanen Tumorentitäten konstitutiv aktiv vorliegt, ist die JAK2-Stat3 Signaltransduktion. Als aktivierter Transkriptionsfaktor ist Stat3 in der Lage, anti-apoptotische und pro-proliferative Effekte durch Hochregulation von anti-apoptischen Molekülen wie Bcl2 und Bcl-xL und von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 in Tumorzellen zu vermitteln (Yu *et al.*, 2009). Zur Überprüfung, ob CCR7-abhängig Stat3 in Eμ-Myc Lymphom- und B-Zellen aktiviert wird, wurden Wt und CCR7 defiziente Zellen mit CCL21 stimuliert und im Westernblot analysiert (Abb. 39). Während für Wt Eμ-Myc-Lymphom- und B-Zellen eine zeitabhängige Zunahme der Stat3 Phosphorylierung festgestellt werden konnte, blieb der Grad an phosphoryliertem Stat3 in CCR7 defizienten Lymphom- und B-Zellen konstant. Für Wt Eμ-Myc-Lymphomzellen wurde häufig die dargestellte Phosphorylierungskinetik mit Abnahme der Phosphorylierung nach 10 min Stimulation und erneuter Zunahme nach 20 min Stimulation erhalten. Im Allgemeinen fiel im Vergleich zur CCR7 induzierten Akt-Phosphorylierung die induzierte Stat3-Phosphorylierung in Eμ-Myc Lymphom- und B-Zellen eher gering aus.

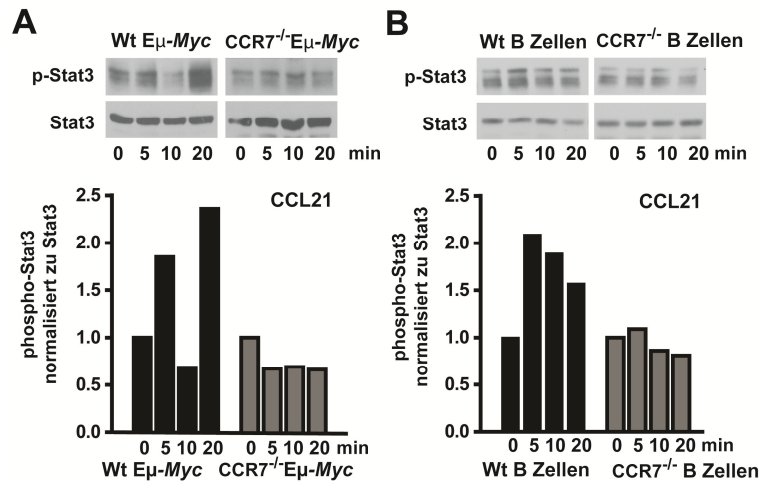


Abb. 39: CCR7 Aktivierung induziert Stat3-Signaltransduktion in Eμ-Myc-Lymphom- und B Zellen
 Frisch isolierte Wt oder CCR7^{-/-}-Lymphomzellen aus Eμ-Myc-transgenen Tieren (A) bzw. aufgereinigte B-Lymphozyten aus Wt oder CCR7-defizienten Mäusen (B) wurden mit 500 ng/ml CCL21 stimuliert und im Westernblot auf eine Aktivierungs-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat3 (p-Stat3) analysiert. Die quantitative Auswertung (untere Reihe) erfolgte durch die Bestimmung des Anteils an phosphoryliertem Stat3-Protein zum gesamten Stat3-Protein (Stat3) der Zellen. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Experiment von 13 (Wt Eμ-Myc-Lymphomzellen), 5 (CCR7^{-/-}-Eμ-Myc-Lymphomzellen) bzw. 3 (Wt und CCR7^{-/-}-B Zellen) unabhängigen Experimenten.

Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass eine Tumorzell-intrinsische CCR7-abhängige Aktivierung von Akt und Stat3-Signalwegen zum Überleben von Eμ-Myc-Zellen in der T-Zellzone beitragen könnte.

4.11 Eμ-Myc-Lymphomzell-induzierte reziproke Interaktionen mit T-Zellzonen-Stromazellen begünstigen die Lymphomentwicklung

4.11.1 Eμ-Myc-Lymphomzellen interagieren mit Stromazellen der T-Zellzone

Neben Tumorzell-intrinsischen Mechanismen wie die CCR7-abhängige Aktivierung von Überlebenssignalwegen in Eμ-Myc Lymphomzellen wurde vermutet, dass CCR7 zum Überleben von Lymphomzellen beiträgt, indem es die Tumorzellen in wachstumsfördernde Stromazellnischen der follikulären T-Zellzone positioniert. In der T-Zellzone befinden sich als Stromazelltypen verschiedene Subpopulationen an dendritischen Zellen (DCs) und Netzwerke von gp38⁺ retikulären fibroblastischen Zellen (FRCs). Die Mechanismen der lymphatischen Neogenese und Homöostase sind unter physiologischen Bedingungen partiell bekannt (s.a. Kap. 1.3.3), ihr Beitrag zum Wachstum maligner B-Zellen hingegen ist weitestgehend unbekannt.

Um anatomische Lagebeziehungen zwischen E μ -Myc-Lymphomzellen und Stromazellen der T-Zellzone genauer darstellen zu können, wurden Gefrierschnitte von Milzen aus Empfänger-mäusen von Wt bzw. CCR7^{-/-} E μ -Myc Lymphomzellen mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 40).

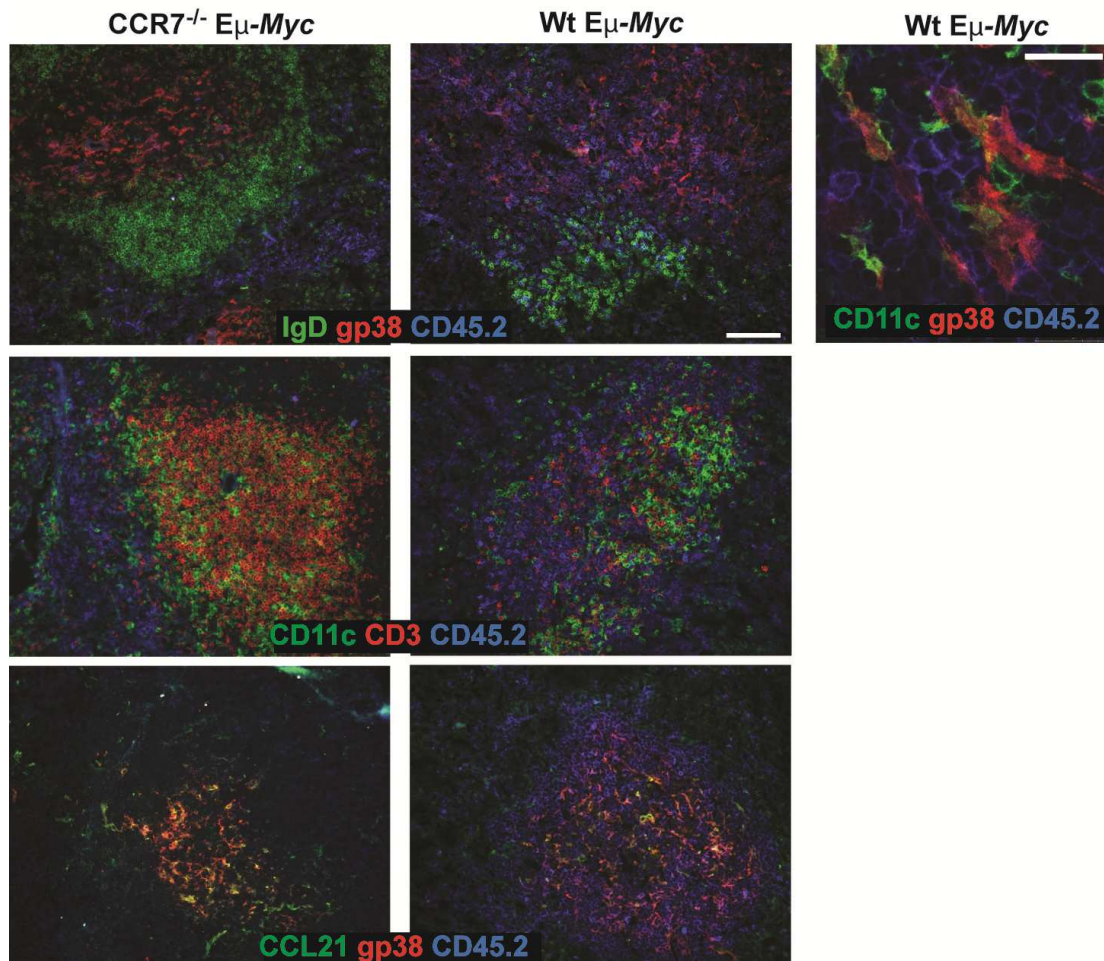


Abb. 40: E μ -Myc Lymphomzell-Lokalisation in Stromazellnischen lymphatischer Follikel Um die Lokalisation von Wt und CCR7^{-/-}E μ -Myc Lymphomzellen in Stromazellnischen lymphatischer Follikel genauer analysieren zu können, wurden Gefrierschnitte von Milzen erkrankter Empfänger-mäuse mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Wt und CCR7^{-/-} Lymphomzellen sind in der obersten Reihe in blau (CD45.2+), Netzwerke von gp38⁺ FRCs in rot und B-Zellzonen in grün (IgD⁺) dargestellt. Deutlich ist eine Kolokalisation der Wt-Lymphomzellen mit dem gp38⁺-Zellnetzwerk erkennbar (Maßstab: 100 μ m). Die Wt-Lymphomzellen (blau) kolokalisieren auch mit DCs (grün, CD11c⁺) innerhalb und benachbart zur T-Zellzone (rot, CD3⁺), dargestellt in der mittleren Reihe. In der vergrößerten konfokalen Mikroskopie (obere Reihe, rechts) wird der simultane Kontakt von Wt E μ -Myc-Lymphomzellen (blau) mit dem gp38⁺-Zell-Netzwerk (rot) und DCs (grün) deutlich (Maßstab: 25 μ m). Die untere Reihe zeigt die Kolokalisation des gp38⁺-Zellnetzwerkes (rot) mit dem Chemokin CCL21 (grün). Die hier dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit n = 4-5 Mäusen pro Gruppe.

Wt E μ -Myc-Zellen waren in der T-Zellzone in einem engen Kontakt zum gp38⁺-Zellnetzwerk und den darin befindlichen DCs zu sehen (oberste Reihe, Mitte). Bei höherer Auflösung (obere Reihe, rechts) sah man deutlich die unmittelbare Nähe zwischen Tumorzellen und gp38⁺-

Zellen bzw. DCs, welche eine Art Nische bildeten, die durch die Tumorzellen besetzt worden war. Im Gegensatz hierzu waren CCR7^{-/-} Eμ-Myc-Zellen von dieser T-Zellzonennische komplett ausgegrenzt und akkumulierten stattdessen in der roten Pulpa (oberste Reihe, links). Wt Eμ-Myc Zellen führten in der T-Zellzone zu einer drastischen Reduzierung an CD3⁺ T-Zellen (mittlere Reihe, rechts), wohingegen das gp38⁺ Netzwerk weiterhin intakt blieb (untere Reihe, rechts). Das gp38⁺ Netzwerk war zusätzlich durch eine hohe CCL21-Expression charakterisiert, welches für die CCR7-abhängige Positionierung der Wt-Lymphomzellen in der T-Zellzone verantwortlich ist.

Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass innerhalb von Stromazellnischen, die aus dem Netzwerk von gp38⁺ FRCs und DCs gebildet werden, Eμ-Myc-Lymphomzellen parakrine Überlebenssignale erhalten. Im Folgenden galt es nun die Rolle von gp38⁺-Zellen und DCs in der Vermittlung von Überlebenssignalen an Eμ-Myc-Lymphomzellen in der T-Zellzone näher zu dissezieren.

4.11.2 Eμ-Myc Lymphomzellen induzieren Netzwerke von gp38⁺ Stromazellen *in vivo*

Die strukturelle Stabilität des gp38⁺ Netzwerkes in der T-Zellzone von lymphatischen Follikeln in Empfänger-mäusen von Wt-Eμ-Myc-Lymphomzellen ließ vermuten, dass diese Stromazellpopulation eine unterstützende Funktion in der Lymphompathogenese besitzt. Entscheidend für die strukturelle und funktionelle Integrität dieser Stromazellen ist eine aktive LTβ-Rezeptor-Signaltransduktion, welche physiologisch durch die Expression von LTα und LTβ auf T-Zellen in der T-Zellzone gewährleistet wird (Ware, 2005). Da auch Eμ-Myc-Lymphomzellen LTα exprimieren, stellte sich die Frage, ob Eμ-Myc Lymphomzellen durch die Einwanderung in die T-Zellzone eine verstärkte Neogenese oder Differenzierung von gp38⁺CD45⁻ FRCs aus unreifen mesenchymalen Vorläuferzellen bewirken können. Um dies beantworten zu können, wurden gp38⁺-Zellen aus den Milzen von naiven und Eμ-Myc-Transfertiern durch Kollagenaseverdau isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 41).

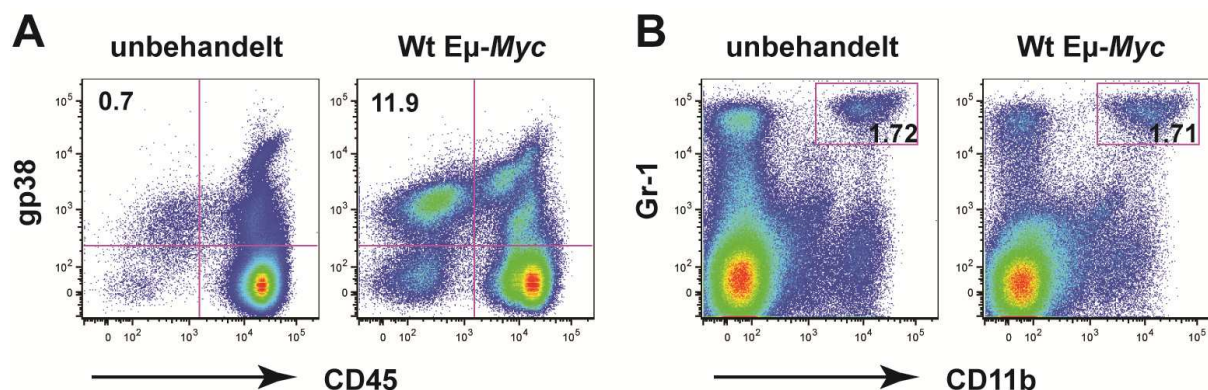


Abb. 41: Eμ-Myc-Lymphomzellen induzieren eine Expansion des gp38⁺-Zellnetzwerkes *in vivo*, jedoch keine Expansion von unreifen myeloiden Suppressorzellen Milzen aus naiven Wt C57BL/6 Mäusen (n = 5) oder Eμ-Myc transplantierten Mäusen (Tag 10-13 nach Transfer, n = 6) wurden mit Kollagenase verdaut und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Zahlen in den Graphen geben den prozentualen Anteil an gp38⁺/CD45⁻ FRCs (A) bzw. CD11b⁺/Gr-1⁺ unreifen myeloiden Suppressorzellen (B) in unbehandelten und Eμ-Myc Transfermäusen an (*P ≤ 0.05 für gp38⁺/CD45⁻ und P = n.s. für CD11b⁺/Gr-1⁺).

In der Tat war in Empfängermäusen von Wt Eμ-Myc Lymphomzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen eine signifikante Expansion der gp38⁺/CD45⁻ Population zu verzeichnen (Abb. 41-A: 0.40 ± 0.25 % SD für unbehandelte Mäuse und 7.26 ± 5.35 % SD für Wt Eμ-Myc; *P ≤ 0.05).

Parallel wurde in diesen Versuchen ermittelt, ob Eμ-Myc-Zellen auch zu einer Expansion von CD11b⁺Gr-1⁺ Stromazellen führen (Abb. 41-B). Diese sind auch als unreife myeloide Suppressorzellen (MDSC) bekannt und üben in zahlreichen Tumoren immunsupprimierende Funktionen aus (Peranzoni *et al.*, 2010). Für diese Population konnte jedoch zum Zeitpunkt der Analyse (10-13 Tage nach Tumorzelltransfer) keine Expansion im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt werden.

4.11.3 gp38⁺ Stromazellnetzwerke unterstützen das Überleben von Eμ-Myc-Lymphomzellen *in vitro*

Die Rekrutierung von Eμ-Myc-Lymphomzellen in die T-Zellzone durch Bereitstellung der CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 scheint ein entscheidender Mechanismus zu sein, mit dem gp38⁺ Zellen zur Lymphompathogenese im Eμ-Myc-Lymphommodell beitragen könnten. Hierdurch wird gewährleistet, dass die Lymphomzellen in eine wachstumsstimulierende Umgebung gelangen. Neben der Rekrutierungsfunktion war es aber auch denkbar, dass gp38⁺-Zellen selber in die Vermittlung von Überlebenssignalen involviert sind. Diese Vermutung basierte vor allem auf der Beobachtung, dass gp38⁺ FRCs das Überleben von naiven T-Zellen

in der T-Zellzone durch Sekretion von IL-7 und CCL19 unterstützen (Link *et al.*, 2007). Um überprüfen zu können, ob gp38⁺-Zellen zum Überleben von E μ -Myc-Lymphomzellen beitragen, wurde ein *in vitro* Zellkultursystem für primäre gp38⁺ Zellen in dieser Arbeit entwickelt (Abb. 42).

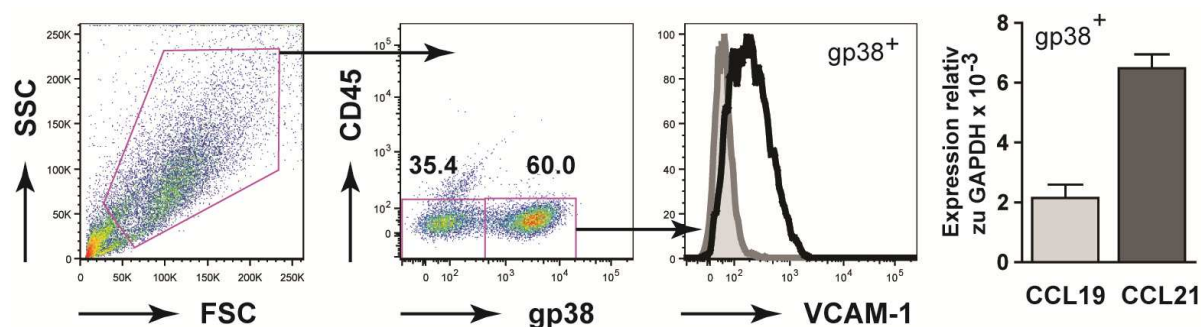


Abb. 42: Isolation und Kultur von primären gp38⁺ Zellen Für die Isolation und Kultivierung von primären gp38⁺ FRCs *in vitro* wurden Milzen und Lymphknoten von Wt C57BL/6 Mäusen mit Kollagenase verdaut und adhärenente Zellen der erhaltenen Einzelzellsuspension für 3-7 Tage kultiviert (vier unabhängige Experimente). Nach Entfernung CD11b positiver Makrophagen wurden die Stromazellen mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen CD45, gp38 und VCAM-1 analysiert. Der Anteil an gp38⁺/CD45⁻ Zellen betrug in der Regel zwischen 40 und 60%. In der rechten Abbildung ist eine quantitative RT-PCR-Analyse der CCL19 und CCL21 Expression von *in vitro* kultivierten gp38⁺ Zellen (Tag 3 der Kultur) dargestellt. Die Expression der Chemokine wurde auf die GAPDH Expression der Zellen normalisiert (zwei unabhängige Experimente).

Die *in vitro* erhaltenen Stromazellkulturen bestanden nach Depletion adhärenenter Makrophagen zu 40-60 % aus gp38⁺CD45⁻ FRCs, die durch eine hohe Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (CD106) charakterisiert waren. Zusätzlich konnte die Expression der Chemokine CCL19 und CCL21 mittels RT-PCR auf RNA-Ebene verifiziert werden. Die Expression der Chemokine war am Tag drei der Kultur jedoch relativ gering. Ursache hierfür waren vermutlich endogene Dedifferenzierungsprogramme aufgrund fehlender Adhäsionskontakte und einer fehlenden LT β -Rezeptorstimulation, die in der natürlichen Umgebung dieser Zellen permanent vorhanden sind.

Die gp38⁺ Zell-angereicherten Stromazellkulturen wurden für Kokulturen mit frisch isolierten E μ -Myc-Lymphomzellen aus transgenen Mäusen verwendet und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. 43).

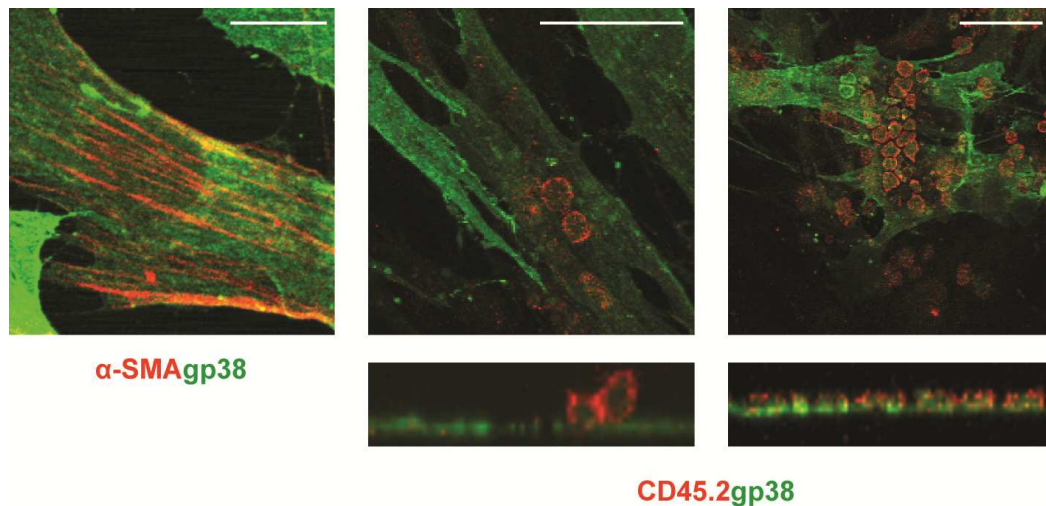


Abb. 43: gp38⁺-Zellen vermitteln Eμ-Myc Lymphomzellen adhärenzte Zellkontakte *in vitro* Kokulturen von *in vitro* kultivierten gp38⁺ Stromazellen und Eμ-Myc-Lymphomzellen wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert. In der linken Abbildung wurden gp38⁺-Zellen mit Antikörpern gegen die gp38⁺-Zellspezifischen Marker gp38 (grün) und α-SMA (rot) gefärbt (Maßstab: 20 µm). Die mittlere und rechte Abbildung verdeutlichen den engen Kontakt zwischen Eμ-Myc-Lymphomzellen (CD45.2⁺, rot) und gp38⁺-Zellen (grün) in *in vitro* Kokulturen beider Zelltypen (Maßstab 50 µm). Unterhalb dieser Abbildungen ist je ein rekonstruierter Seitenanblick dargestellt, auf dem mehrere Eμ-Myc-Zellen zu sehen sind, die stark adhären auf einer gp38⁺-Zelle sitzen.

Die isolierten gp38⁺-Zellen exprimierten den gp38⁺-Zellspezifischen Marker *α-smooth muscle actin* (α-SMA), welcher die korrekte Identität der isolierten gp38⁺-Zellen zusätzlich verifizier- te (obere Reihe, links). α-SMA wird in Myofibroblasten wie Herzmuskelzellen exprimiert und verdeutlicht daher den mesenchymalen Ursprung von gp38⁺ FRCs. Auffällig war, dass in Ko- kulturen mit Eμ-Myc-Lymphomzellen (obere Reihe, Mitte und rechts) Tumorzellen auf gp38⁺-Stromazellen eine weniger apoptotische Morphologie aufwiesen als Tumorzellen, die zwischen den gp38⁺-Stromazellen lokalisiert waren. Die Lymphomzellen wiesen eine starke Adhärenz zu den gp38⁺ Zellen auf, welche möglicherweise durch VCAM-1 oder auch andere Adhäsionsmoleküle vermittelt wurde.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden Eμ-Myc-Lymphomzellen in An- und Abwesenheit von gp38⁺ Stromazellen kultiviert. Da die angereicherten Stromazellpopulationen neben gp38⁺CD45⁻CD11b⁻ FRCs (40-60 %) auch gp38⁻CD11b⁻ Stromazellen enthielten, wurden zusätzlich Kokulturen nur mit gp38⁻CD11b⁻ Stromazellen durchgeführt. gp38⁻CD11b⁻ Stroma- zellen wurden aus FRC angereicherten Stromazellkulturen durch Depletion von gp38⁺ Stro- mazellen erhalten. Der Anteil an apoptotischen Lymphomzellen wurde mittels Durchflusszy- tometrie bestimmt. (Abb. 44).

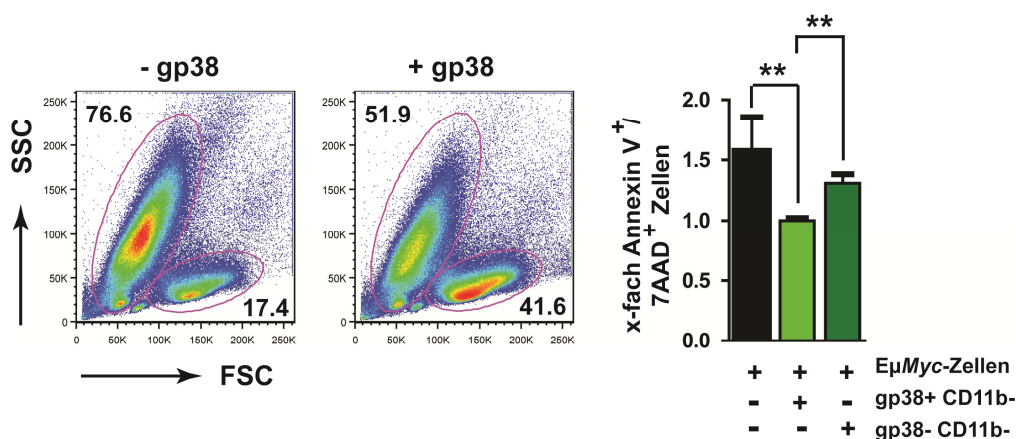


Abb. 44: gp38⁺-Zellen vermitteln Eμ-Myc-Lymphomzellen Überlebenssignale *in vitro* Eμ-Myc-Lymphomzellen wurden frisch isoliert, für zwanzig Stunden mit *in vitro* angereicherten gp38+CD11b- Stromazellen ko-kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist das FSC gegen SSC Profil von Lymphomzellen die mit oder ohne Stromazellen (40-60% gp38+/CD45-/CD11b- Zellen) für zwanzig Stunden kultiviert wurden. Der Anteil an spätapoptotischen Lymphomzellen wurde durch Färbung mit Annexin V und 7 AAD bestimmt (Annexin V⁺, 7 AAD⁺ doppelt positive Zellen). In der rechten Abbildung ist der Anteil an apoptotischen Lymphomzellen in Abwesenheit von Stromazellen als Vielfaches des Anteiles von apoptotischen Lymphomzellen in Anwesenheit von gp38+CD11b- Stromazellen (willkürlich gleich 1 gesetzt) dargestellt. Zusätzlich ist als Vielfaches der Anteil an apoptotischen Lymphomzellen in Anwesenheit von gp38-CD11b- Stromazellen zu sehen (n = 7 Experimente; **P ≤ 0.01).

Bereits 20 Stunden nach Beginn der Kokultur konnte für Eμ-Myc-Lymphomzellen, die mit gp38⁺CD11b⁻ angereicherten Stromazellen kokultiviert wurden, ein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt werden. Dieser war vor allem auf die Anwesenheit von gp38⁺ FRCs zurückzuführen, da die Abwesenheit von gp38⁺ FRCs in Kokulturen mit gp38⁻CD11b⁻ Stromazellen durch einen signifikant erhöhten Anteil an apoptotischen Lymphomzellen charakterisiert war.

Ingesamt zeigen diese Ergebnisse, dass gp38⁺ FRCs entscheidend zur Eμ-Myc Lymphompathogenese beitragen, indem sie zum einen die für die T-Zellzonen spezifische Migration benötigten Chemokinliganden CCL19 und CCL21 exprimieren, und zum anderen parakrine Überlebensfaktoren wie Adhäsionskontakte den Tumorzellen zur Verfügung stellen.

4.12 Dendritische Zellen stellen Eμ-Myc-Lymphomzellen Überlebensfaktoren zur Verfügung

4.12.1 Dendritische Zellen begünstigen Eμ-Myc-Lymphomwachstum *in vitro und vivo*

Neben den FRC exprimierten Chemokinen CCL19 und CCL21 war es vorstellbar, dass weitere wachstumsfördernde Faktoren durch andere Stromazelltypen der T-Zellzone den Eμ-Myc-

Lymphomzellen zur Verfügung gestellt werden. Hierbei kamen verschiedene Subpopulationen von dendritischen Zellen (DCs) in Frage, die einen weiteren wichtigen Stromazelltyp in der T-Zellzone darstellen. Um feststellen zu können, ob DCs im allgemeinen E μ -Myc-Lymphomzellen Überlebenssignale vermitteln, wurden Kokulturen von frisch isolierten Lymphomzellen und *in vitro* generierten murinen DCs aus dem Knochenmark angelegt und die Apoptoserate der Tumorzellen 20 Stunden später mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 45).

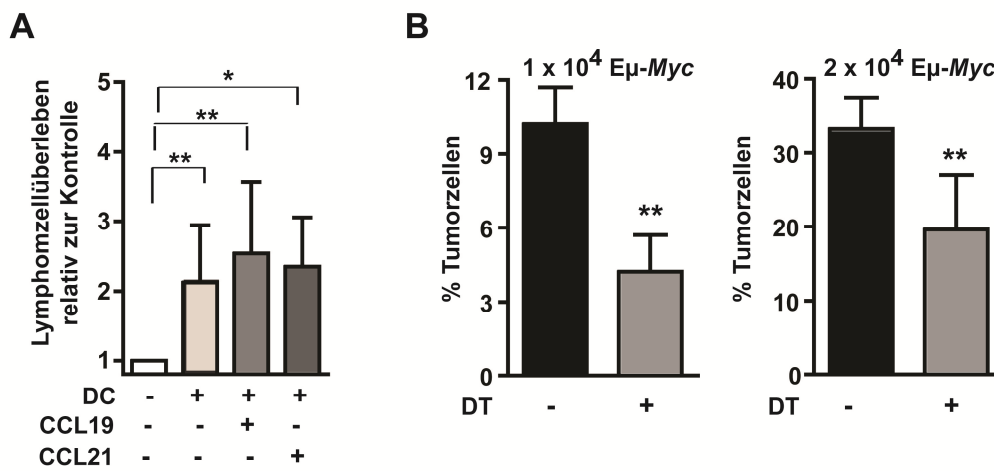


Abb. 45: Dendritische Zellen tragen zum Überleben von E μ -Myc-Lymphomzellen bei (A) Frisch isolierte E μ -Myc-Lymphomzellen aus dem Lymphknoten erkrankter E μ -Myc transgener Tiere wurden mit *in vitro* generierten myeloischen DCs aus dem Knochenmark für 20 Stunden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 500 ng/ ml rekombinanten CCL19 bzw. CCL21 ko-kultiviert. Anschließend wurde der Anteil an lebenden B220+/ Annexin V-/ 7AAD- Lymphomzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist das Lymphomzellüberleben als Vielfaches relativ zum Lymphomzellüberleben in Abwesenheit von DCs (willkürlich gleich 1 gesetzt). Insgesamt wurde das Experiment für 4-9 verschiedene E μ -Myc-Zellklone pro Ansatz durchgeführt. (B) Zur *in vivo* Depletion von CD11c+ DCs wurde CD11c-DTR transgenen Mäusen täglich Diphtherie-Toxin (DT) i.p. gespritzt. Einen Tag nach Beginn der DT-Injektionen wurden 1×10^4 bzw. 2×10^4 GFP exprimierende E μ -Myc Zellen i.v. transplantiert. Die Menge an Tumorzellen in den Milzen von DC depletierten Mäusen (graue Balken) und nicht DC depletierten Kontrollmäusen (schwarze Balken) wurde 9-10 Tage nach Tumorzelltransfer mittels Durchflusszytometrie bestimmt (n = 3 bzw 9 DC-depletierte Mäuse und n = 3 bzw. 9 Kontrollmäuse) (* P \leq 0.05; ** P \leq 0.01).

In diesen *in vitro* Kokulturen war das Überleben der Lymphomzellen stark von der Anwesenheit von DCs abhängig. So waren E μ -Myc Lymphomzellen in Abwesenheit von DCs deutlich apoptotischer als in Anwesenheit von DCs (Abb. 45-A). Die Zugabe von rekombinantem CCL19 bzw. CCL21 führte nur zu einer moderaten Erhöhung der Überlebensrate im Vergleich zu Tumorzellen, die ohne Chemokine mit DCs kokultiviert wurden. Dies deutete darauf hin, dass neben CCL19 und CCL21 weitere Überlebensfaktoren den Lymphomzellen durch DCs zur Verfügung gestellt werden.

Da die verwendeten myeloischen DCs aus dem Knochenmark nicht unbedingt den gleichen Differenzierungsstatus von DCs aus Milz und Lymphknoten aufweisen, mit denen E μ -Myc-Lymphomzellen in der T-Zellzone in Kontakt sind, wurden in einem weiteren Schritt DCs in sekundären lymphatischen Organen *in vivo* depletiert. Hierfür wurde das CD11c.DTR transgene Mausmodell verwendet, in dem die Expression des Diphtherietoxinrezeptors (DTR) unter der Kontrolle des CD11c-Promotors steht. Folglich exprimieren in diesem Mausmodell nur CD11c positive DCs den DTR und können durch Gabe von Diphtherietoxin *in vivo* depletiert werden. Zur Bestimmung der Rolle von DCs im E μ -Myc-Lymphomwachstum *in vivo* wurden 1×10^4 bzw. 2×10^4 E μ -Myc-Zellen in CD11c⁺ DC-depletierte bzw. PBS behandelte Kontrollmäuse injiziert (Abb. 45-B). In beiden Fällen war die Anzahl infiltrierender Tumorzellen in der Milz in DC-depletierten Mäusen im Vergleich zu nicht depletierten Mäusen signifikant reduziert.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass nicht nur gp38⁺-Zellen, sondern auch DCs in der Lage sind E μ -Myc-Lymphomzellen Überlebenssignale zu vermitteln.

4.12.2 Die E μ -Myc-Lymphomzellmigration in SLOs führt zur veränderten Zusammensetzung an DC-Subtypen *in vivo*

Innerhalb der T-Zellzone sind verschiedene Subtypen von DCs lokalisiert, die einen unterschiedlichen Einfluss auf das E μ -Myc-Lymphomwachstum haben könnten. Diese umfassen unter anderem konventionelle CD11c^{hoch} exprimierende CD4⁺ oder CD8⁺ DCs, B220⁺CD11c^{int} plasmazytoide DCs und immunsupprimierende CD11c^{int} regulatorische DC-Subtypen. Um feststellen zu können, ob das Einwandern von E μ -Myc-Zellen zu einer veränderten Zusammensetzung an DC-Subpopulationen in der T-Zellzone führt, wurden DCs aus Milzen von naiven Mäusen und kongenen Empfängermausen von Wt E μ -Myc Lymphomzellen durch Kollagenaseverdau isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 46). Tatsächlich konnte im Vergleich zu naiven Tieren eine drastische Veränderung an DC-Subpopulationen in E μ -Myc-Transfermäusen festgestellt werden. CD11c^{hoch}CD4⁺ exprimierende konventionelle DCs waren signifikant in E μ -Myc-Transfermäusen reduziert (38.33 ± 6.79 % SD für naive Mäuse und 13.1 ± 5.98 % SD für Wt E μ -Myc; *P ≤ 0.05). CD11c^{int}B220⁺ plasmazytoide und CD8⁺ konventionelle DC-Populationen waren dagegen nicht verändert. Auffällig war die signifikante Zunahme an CD11c^{int} exprimierenden DCs in E μ -Myc-Empfängermausen.

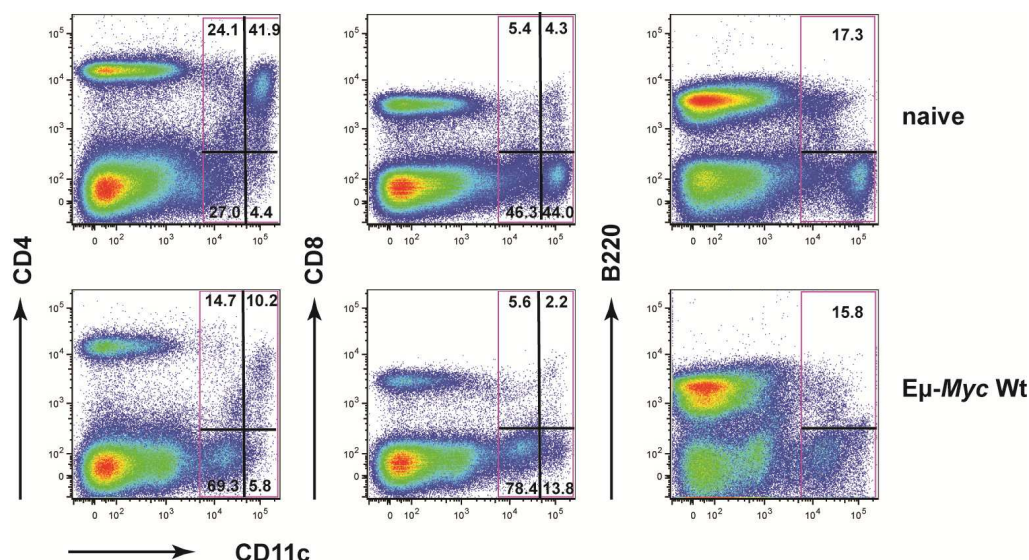


Abb. 46: Eμ-Myc-Lymphomzellen induzieren eine veränderte Zusammensetzung an DC-Subtypen in der Milz Milzen von naiven C57BL/6 Mäusen (n = 4) und Wt Eμ-Myc transplantierten Mäusen (Tag 10-13 nach Transfer, n = 5) wurden mit Kollagenase verdaut und mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen CD11c, CD4, CD8 und B220 analysiert. Die prozentualen Anteile an CD4, CD8 oder B220 exprimierenden DCs innerhalb CD11cintermediär bzw. CD11choch exprimierender DC-Subpopulationen ist in den einzelnen Graphen angegeben. Die Zunahme an CD11c^{int} DCs und Abnahme an CD11choCD4⁺ DCs in Eμ-Myc Transfermäusen war statistisch signifikant (* P ≤ 0.05).

4.12.3 Eμ-Myc Lymphomzellen induzieren die Expansion eines putativ regulatorischen immunsupprimierenden DC-Subtyps

Die Zunahme an CD11c^{int} DCs in der Milz von Empfänger-mäusen von Wt Eμ-Myc Lymphomzellen deutete auf eine Expansion einer DC-Population hin, die als differenzierter regulatorischer DC-Subtyp beschrieben worden ist (Zhang *et al.*, 2004). Differenzierte regulatorische DCs sind im Vergleich zu reifen DCs durch eine niedrigere Expression an CD11c, MHC Klasse II-Molekülen und CD86 sowie durch eine erhöhte Expression an CD80, CD40, VCAM-1 und CD11b charakterisiert. Sie besitzen immunsuppressive Eigenschaften aufgrund einer erhöhten Sekretion an IL-10 und NO bei gleichzeitig verringerter Sekretion an immunaktivierendem IL-12 und TGFβ. Um überprüfen zu können, ob es sich bei der expandierten CD11c^{int} DC-Population in Eμ-Myc Transfermäusen um diesen regulatorischen DC-Phänotyp handelt, wurden weitere Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 47). Vergleichbar zu differenzierten regulatorischen DCs war auch auf CD11c^{int} exprimierenden DCs in Eμ-Myc Transfermäusen neben der geringeren Expression von CD11c eine verringerte Expression an MHC Klasse II-Molekülen (I-A^b) und an CD86 im Vergleich zu reifen CD11c^{hoch} exprimierenden DCs festzustellen. Zusätzlich wiesen die CD11c^{int} DCs in Empfän-

germäusen von Wt E μ -Myc-Zellen die für differenzierte regulatorische DCs charakteristische erhöhte Expression an CD80 auf.

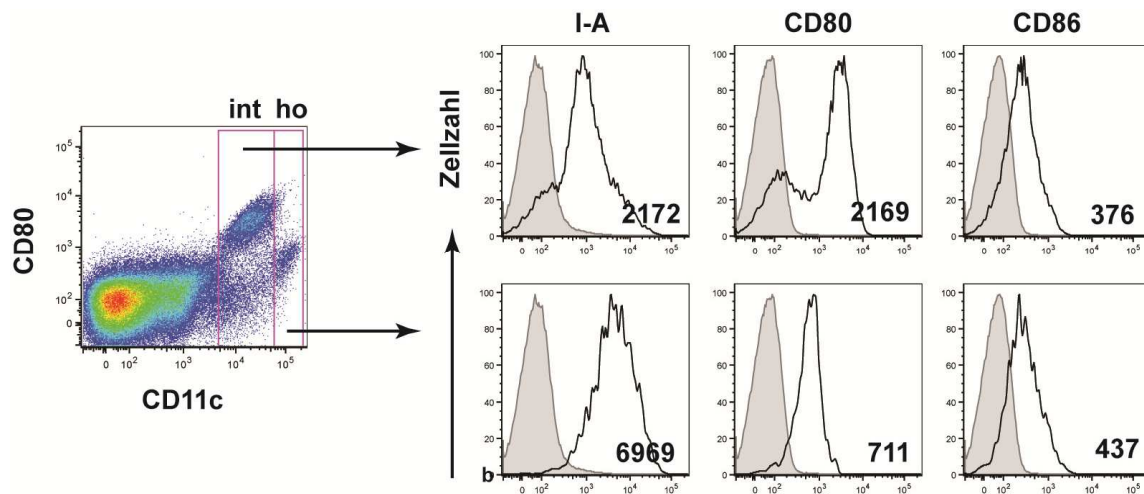


Abb. 47: CD11c^{int} Zellen in E μ -Myc-Transfermäusen weisen Marker von regulatorischen DCs auf Milzen von E μ -Myc transplantierten Mäusen (n = 6) wurden 10-13 Tage nach Lymphomzelltransfer mit Kollagenase verdaut und mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Molekülen (I-Ab) und der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 analysiert. Dargestellt ist die Expression auf CD11c intermediär (int) und CD11c hoch (ho) exprimierenden DC Subpopulationen. Die Zahlen in den Histogrammen repräsentieren die mittleren Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Marker (Isotypkontrolle, graue Kurven).

Als weiterer Marker für differenzierte regulatorische DCs wurde die Expression von VCAM-1 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 48).

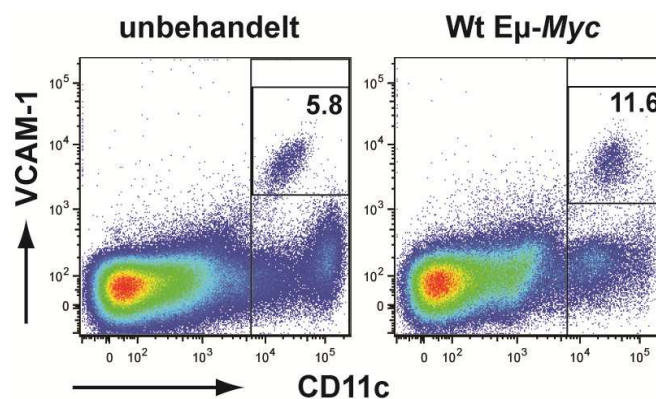


Abb. 48: Expansion von VCAM-1-exprimierenden CD11c^{int} DCs in E μ -Myc-Transfermäusen Milzen aus E μ -Myc-Transfermäusen wurden Kollagenase verdaut und mit Hilfe der Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen CD11c und VCAM-1 analysiert. Der prozentuale Anteil an CD11c⁺/VCAM-1⁺ DCs ist in den Graphen angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten.

Eine positive VCAM-1 Expression war nur auf einer Subpopulation der CD11c^{int} exprimierender DCs in naiven und E μ -Myc-Transfertieren nachweisbar. Diese CD11c^{int}VCAM-1⁺ Population war jedoch in Tumor-tragenden Mäusen signifikant vergrößert.

Allgemein kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass E μ -Myc-Lymphomzellen offenbar in der Lage sind, aktiv die Zusammensetzung von Stromazellpopulationen in der T-Zellzone zu verändern. Dies umfasst nicht nur die bereits beschriebene Expansion des gp38⁺FRC Netzwerkes, sondern auch die Eliminierung von immunaktivierenden DC-Populationen verknüpft mit der Induktion von putativ immunsupprimierenden regulatorischen DCs.

4.12.4 E μ -Myc-Lymphomzellen induzieren ein Wachstum stimulierendes pro-inflammatorisches und pro-adhäsives Milieu

Um näher charakterisieren zu können, ob die veränderte Zusammensetzung an DC-Populationen in Empfänger-mäusen von Wt E μ -Myc-Lymphomzellen zur Ausbildung eines Lymphomwachstumsfördernden Milieus in der Milz beiträgt, wurden vergleichende, quantitative RT-PCR-Analysen mit DCs aus tumor-freien und tumor-tragenden Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden CD11c⁺/ I-A^{b+} DCs aus den Milzen von naiven und E μ -Myc Transfertieren (Tag 10-13 nach Transfer) durch eine Kombination von MACS und FACS-Sortierung in hoher Reinheit isoliert (Reinheitsgrad: $\geq 98\%$) und RNA gewonnen. Die RNA wurde anschließend für ausgewählte quantitative RT-qPCR Arrays verwendet, welche Informationen über Genfunktionen liefern sollten, die in immunregulatorischen und proliferativen Prozessen eine Rolle spielen (Abb. 49). Die Genarray-Analysen lieferten in DCs aus tumor-tragenden Mäusen eine Reihe von hochregulierten Genfunktionen, die allgemein mit der Generierung eines (pro)-inflammatorischen Milieus assoziiert sind (Abb. 49-A). Hierzu gehörten die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6 und INF γ , die Alphakette des IL-2-Rezeptors (CD25), die inflammatorischen Chemokine CCL1 und CCL12, der IL-23 Rezeptor sowie das pleiotrophe Zytokin IL-10. Unter den hochregulierten Genfunktionen befanden sich des Weiteren verschiedene Wachstumsfaktoren wie Igf-1 (*insulin-like growth factor 1*), Fgf-1 (*fibroblastic growth factor 1*) und Hgf (*hepatocyte growth factor*), aber auch das Adhäsionsmolekül VCAM-1. Zusätzlich wurden einige Proliferationsmarker analysiert, welche die DC-Dichte in tumortragenden Mäusen regulieren könnten. Es ergab sich, dass in DCs aus E μ -Myc-Transfertieren negative Zellzyklusregulatoren wie Cdkn2a (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2a*) und der Transkriptionsfaktor C/EBP β um mehr als das dreifache hochreguliert waren, wohingegen die anti-apoptotischen und pro-proliferativen Transkriptionsfaktoren Fos und Jun herunterreguliert waren. In einem Zytokin-Proteinarray konnte die erhöhte Expression von

INF γ , IL-6, IL-10 und VCAM-1 in DCs aus tumor-tragenden Tieren auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 49-B). Die genannten Proteinexpressionen waren um mehr als das Zweifache im Vergleich zu DCs aus naiven Mäusen erhöht. Eine durchflusszytometrische Analyse von E μ -Myc-Lymphomzellen auf korrespondierende Rezeptoren ergab zusätzlich, dass die Lymphomzellen hoch den Igf1-, IL-10- und INF γ -Rezeptor exprimierten (nicht dargestellt).

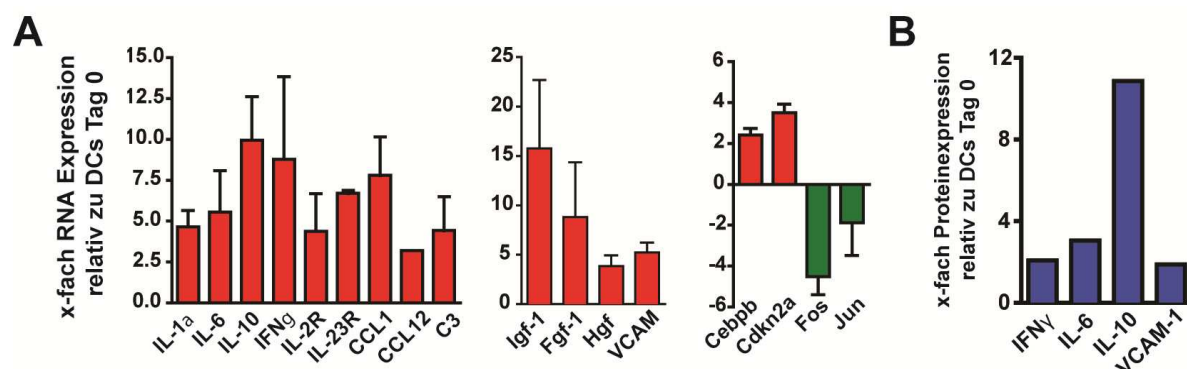


Abb. 49: E μ -Myc-Lymphomzellen induzieren ein pro-inflammatorisches, wachstumsstimulierendes Milieu durch Veränderung der Genexpression von dendritischen Zellen (A) Für comparative quantitative RT-PCR-Analysen wurde RNA aus DCs isoliert, welche entweder von unbehandelten Kontrolltieren oder E μ -Myc-Transfertiern (Tag 10-13 nach Transfer) stammten. Die cDNA wurde anschließend auf verschiedene RT-PCR Microarrays gegeben, welche eine simultane Analyse zahlreicher Genfunktionen ermöglichte. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit $n = 10$ Mäusen pro Gruppe. Die Änderung der Genexpression in DCs aus E μ -Myc-Transferrmäusen in als Vielfaches der Genexpression in DCs aus unbehandelten Tieren dargestellt. Die ersten beiden Diagramme zeigen hochregulierte Genfunktionen, welche mit Entzündung, Wachstumskontrolle und Adhäsion assoziiert sind. Im dritten Diagramm sind die Hochregulation von negativen Zellzyklusregulatoren sowie die Herunterregulation von Überleben-stimulierenden Transkriptionsfaktoren abgebildet. (B) DCs aus naiven C57BL/6 Mäusen ($n = 6$) und E μ -Myc transplantierten Mäusen ($n = 5$) wurden isoliert und lysiert. Jeweils 180 μ g Proteinlysate wurden anschließend auf einen Zytokin-Antikörper-Array gegeben, welcher die gleichzeitige Analyse der Expression von 64 Zytokinen erlaubte. Dargestellt sind Zytokine, deren Proteinexpression in DCs von E μ -Myc-Transferrmäusen mehr als 2-fach hochreguliert war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen.

Zusammenfassend ergeben die Daten der Arrayanalysen, dass E μ -Myc-Lymphomzellen durch Veränderung der Genexpression von DCs sich ein pro-inflammatorisches, anti-apoptotisches und pro-adhäsives Milieu verschaffen. Auf diese Weise könnten sie eine wachstumsfördernde, immunprivilegierte Nische in der T-Zellzone der Milz induzieren.

4.12.5 DC produzierte Ihh-Liganden vermitteln Überlebenssignale in E μ -Myc-Lymphomzellen

In vitro Kokulturen von E μ -Myc-Lymphomzellen und myeloischen DCs aus dem Knochenmark hatten einen signifikanten Überlebensvorteil für Tumorzellen ergeben, die in Anwesen-

heit von DCs kultiviert wurden. Dieser Überlebensvorteil wurde nur geringfügig erhöht, wenn man zusätzlich rekombinantes CCL19 und CCL21 der Kultur zufügte (Abb. 45-A). Dies deutete bereits daraufhin, dass DCs neben CCL19 und CCL21 den Lymphomzellen wichtigere Überlebensfaktoren zur Verfügung stellen. Um allgemein feststellen zu können, ob an der Vermittlung dieser Überlebenssignale Gai-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt sind, wurde Pertussistoxin zur Inhibition der Gai-Signaltransduktion der Kokultur zugefügt (Abb. 50).

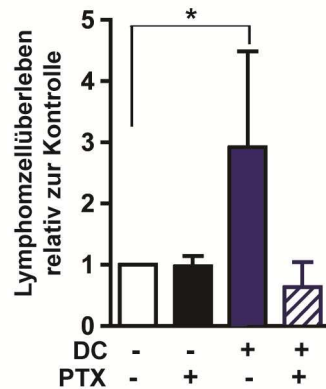


Abb. 50: Pertussis-Toxin inhibierte GPCR-Signaltransduktion in Eμ-Myc/ DC-Kokulturen verringert Lymphomzellüberleben *in vitro* Eμ-Myc-Lymphomzellen wurden aus den Lymphknoten erkrankter Eμ-Myc-transgener Mäuse isoliert und mit *in vitro* generierten myeloischen DCs aus dem Knochenmark für zwanzig Stunden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 0.5 µg/ ml Pertussistoxin (PTX) ko-kultiviert. Das Lymphomzellüberleben wurde anschließend relativ zur Kontrolle (Kultivierung ohne DCs) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Anteil an lebenden B220+/ Annexin V-/ 7AAD- Lymphomzellen als Vielfaches relativ zur Kontrolle (n = 4-9 verschiedene Eμ-Myc-Zellklone pro Ansatz; *P ≤ 0.05).

Die Zugabe von Pertussistoxin hatte zunächst keinen Effekt auf das Überleben von solchen Eμ-Myc-Lymphomzellen, die in Abwesenheit von DCs kultiviert wurden. Anders verhielt es sich in Kulturen mit DCs. Hier wurde das Überleben der Eμ-Myc-Lymphomzellen drastisch in Anwesenheit von Pertussistoxin reduziert. Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass ein oder mehrere DC exprimierte Faktoren über Tumorzell-lokalisierte Gai-gekoppelte Rezeptoren Überlebenssignale in Eμ-Myc-Zellen vermitteln.

Da gezeigt werden konnte, dass im Eμ-Myc-Mausmodell eine Inhibition der Hedgehog-Signaltransduktion Lymphomzellapoptose induziert (Dierks *et al.*, 2007) (s.a. Kap. 1.5.6), entstand die Idee, dass möglicherweise Hedgehog-Liganden wie Ihh und Shh Überlebensfaktoren darstellen, die von DCs zur Verfügung gestellt werden. Es ist allgemein bekannt, dass Hedgehog-Proteine in lymphatischen Geweben exprimiert werden. Keine Informationen liegen jedoch über die Identität der Stromazellpopulationen vor, die diese Liganden exprimieren. Bisher ging man davon aus, dass Ihh nur von Stromazellen im Knochenmark exprimiert wird (Kobune *et al.*, 2004), Shh dagegen von Stromazellen in Milz und Lymphknoten (Sacedon *et*

al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass Shh von FDCs (follikuläre DCs in der B-Zellzone) im Lymphknoten produziert wird. Eine Expression von Hedgehog-Liganden durch Stromazellen der T-Zellzone war jedoch nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden DCs aus dem Knochenmark, DCs aus der Milz von naiven und E μ -Myc-Transfermäusen sowie gp38⁺ Stromazellkulturen mittels RT-PCR auf eine Expression von Ihh und Shh analysiert. Als Positivkontrolle diente RNA aus Magengewebe, welches dafür bekannt ist, beide Liganden hoch zu exprimieren (Abb. 51-A).

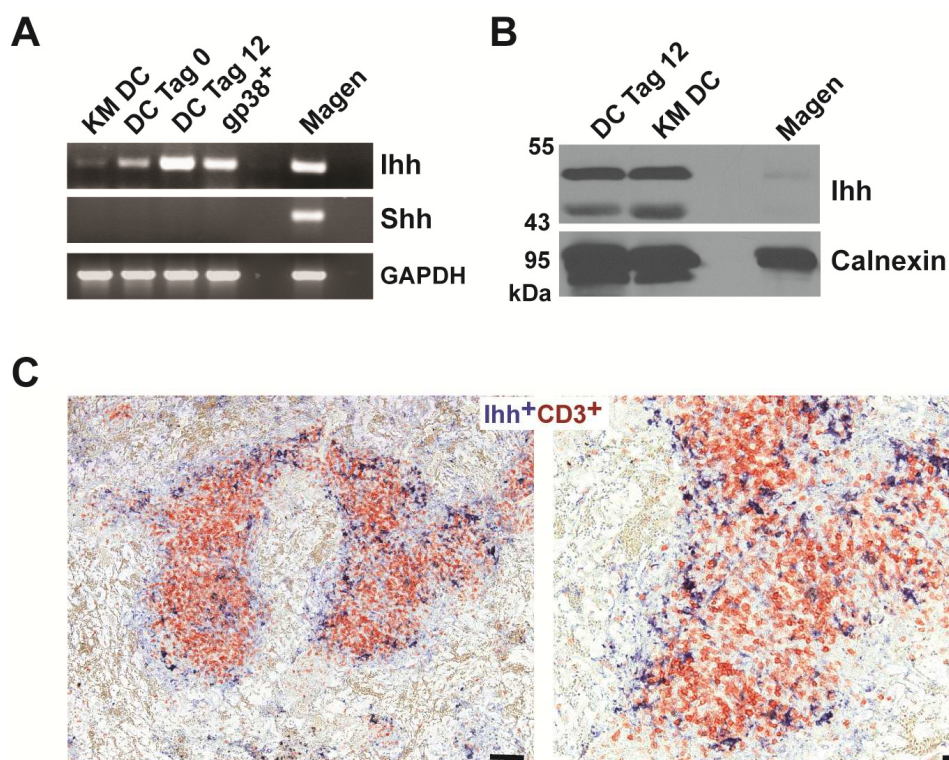


Abb. 51: Stromazellen der T-Zellzone exprimieren den Hedgehog-Liganden Ihh (A) Die Expression der Hedgehog-Liganden Ihh und Shh in Stromazellen der T-Zellzone wurde mittels RT-PCR analysiert. Hierfür wurde RNA aus myeloischen Knochenmark (KM)-DCs, aus FACS-Sorter aufgereinigten DCs von naiven Mäusen (Tag 0) und E μ -Myc-Transfermäusen (Tag 12) und aus gp38⁺-Zell angereicherten Stromazellkulturen isoliert und revers transkribiert. Als positiv-Kontrolle diente RNA aus dem Mausmagen. (B) Zum Nachweis der Ihh Expression auf Proteinebene wurden Proteinlysate von aufgereinigten DCs aus E μ -Myc-Transfermäusen (Tag 12) und von myeloischen Knochenmark-DCs hergestellt und im Westernblot analysiert. Zusätzlich wurde auf das Gel Proteinlysate von Mausmägen aufgetragen. (C) Für die Bestimmung der Lokalisation von Ihh-Liganden in primären Mausgewebe wurden 4 μ m Paraffin-eingebettete Milzschnitte mit Antikörpern gegen CD3 (rot) und Ihh (blau) gefärbt (Maßstab: 100 μ m). Deutlich ist eine Lokalisation des Ihh Proteins in der T-Zellzone der weißen Pulpa zu sehen.

Die RT-PCR Analyse ergab eine Expression von Ihh in allen getesteten Stromazellpopulationen, jedoch keine für Shh. In DCs aus Tumor-erkrankten E μ -Myc Mäusen und aus dem Knochenmark konnte die Ihh-Proteinexpression mittels Westernblot bestätigt werden (Abb. 51-B). Zusätzlich war eine deutliche Ihh-Proteinexpression in immunhistochemischen Färbungen von Milzschnitten nachweisbar (51-C). Ihh-produzierende Stromazellen waren klar in der T-

Zellzone lokalisiert, welche durch Färbung mit Antikörpern gegen CD3 sichtbar gemacht wurde.

Um die Bedeutung der Hedgehog-Signaltransduktion für das Überleben von E μ -Myc-Lymphomzellen in DC-, aber auch in gp38⁺FRC-Kokultursystemen verifizieren zu können, wurden Kokulturen in Anwesenheit von Cyclopamin durchgeführt. Cyclopamin ist ein Alkaloid, welches an den Gai-gekoppelten Rezeptor Smoothened irreversibel bindet und ihn in einer inaktiven Konformation hält. Die Hedgehog-Signaltransduktion ist somit inhibiert (Abb. 52).

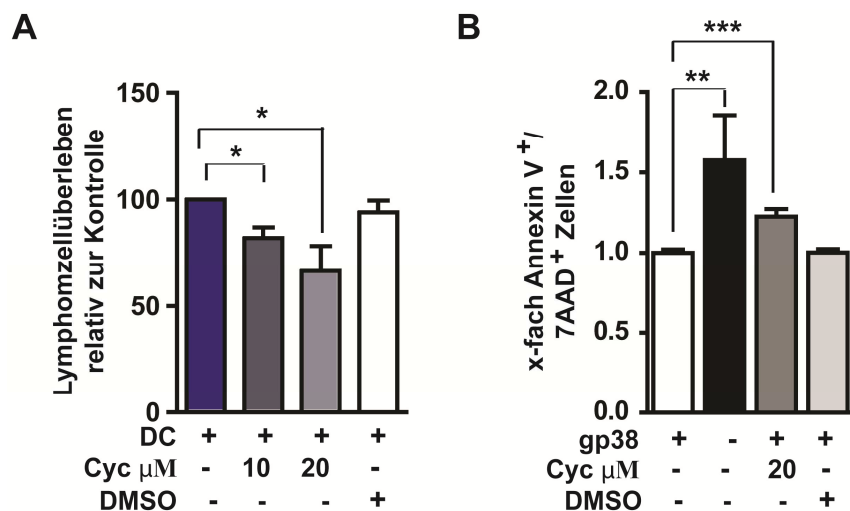


Abb. 52: Inhibition der Hedgehog-Signaltransduktion in DC und gp38⁺FRC Kokulturen führt zu verringertem Lymphomzellüberleben *in vitro* (A) E μ -Myc-Zellen aus den Lymphknoten erkrankter E μ -Myc transgener Mäuse wurden mit myeloischen DCs aus dem Knochenmark für zwanzig Stunden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 bzw. 20 μ M Cyclopamin für 20-22 h ko-kultiviert. Da das Cyclopamin in DMSO gelöst war, wurde reines DMSO als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Anzahl an lebenden Lymphomzellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an lebenden B220⁺/Annexin V⁻/7AAD⁻ Tumorzellen relative zur Kontrolle (Lymphomzellen ohne DCs, willkürlich auf 100 % gesetzt). Insgesamt wurden pro Ansatz je vier verschiedene E μ -Myc-Zellklone getestet. (B) E μ -Myc Lymphomzellen wurden für 20-22 h mit gp38⁺-Stromazellen in An- oder Abwesenheit von 20 μ M Cyclopamin bzw. DMSO kokultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Anteil an spätapoptotischen Annexin V⁺/7AAD⁺ Lymphomzellen ist als Vielfaches des Anteils an spätapoptotischen Lymphomzellen in Anwesenheit von Stromazellen (willkürlich gleich 1 gesetzt) dargestellt (n = 7 Experimente; *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, *** P \leq 0.001).

Die Cyclopaminbehandlung führte zu einer signifikanten, Dosis-abhängigen Reduktion an überlebenden Lymphomzellen in E μ -Myc/ DC Kokulturen bzw. zu einem erhöhten Anteil an spätapoptotischen Lymphomzellen in E μ -Myc/ gp38⁺FRC Kokulturen.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass E μ -Myc-Lymphomzellen durch Einwanderung in die T-Zellzone eine Apoptoseresistenz erhalten, welche sich u.a. aus der räumliche Nähe zu DCs und FRCs ergibt, die das Hedgehog Protein Ihh exprimieren.

5 Diskussion

Identifikation CXCR7 vermittelter Funktionen in der physiologischen und pathophysiologischen T-Zellentwicklung

5.1 CXCR7 wird präferenziell in aktivierten und entarteten T-Zellen exprimiert

Die thymische T-Zellentwicklung ist ein komplexer Differenzierungsprozess, in dem funktionelle TCRs durch ein sequentielles Rearrangement der *tcrα* und *tcrβ* Gene, gefolgt von anschließenden Selektionsschritten, ausgebildet werden. Welche Funktionen CXCL12 und CXCR4 in diesen Prozessen spielen, war lange nicht bekannt. In den vergangenen Jahren konnten nun für CXCR4 bedeutende Funktionen in der thymischen β -Selektion identifiziert werden. So vermittelt CXCR4 die Migration von DN Thymozyten in die CXCL12 reiche subkapsuläre Zone des Thymus (Plotkin *et al.*, 2003) und wirkt dort als Kostimulator zu präTCR vermittelten Überlebenssignalen (Tramont *et al.*, 2010). Welchen Einfluss eine CXCR7 Expression auf diese CXCL12-abhängigen Prozesse ausüben könnte, wurde bisher nicht näher analysiert und war daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die CXCR7 Expression im hämatopoetischen System, insbesondere aber auch in der T-Zellentwicklung, wird äußerst kontrovers diskutiert. So wurde vor kurzem beschrieben, dass CXCR7 überhaupt nicht in humanen und murinen Leukozyten exprimiert wird (Berahovich *et al.*, 2010). Andere Studien hatten dagegen eine Oberflächenexpression von CXCR7 auf humanen Monozyten, B-Zellen und aktivierten DCs gezeigt (Infantino *et al.*, 2006; Sanchez-Martin *et al.*, 2010). In peripheren humanen T-Zellen konnte keine (Infantino *et al.*, 2006) bzw. nur eine marginale Oberflächenexpression festgestellt werden (Balabanian *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2008). Diese unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich auf die Verwendung unterschiedlicher Antikörperklone gegen humanes CXCR7 zurückführen. Momentan wird der Klon 11G8 als einziger spezifischer und FACS-tauglicher Antikörper angenommen (Berahovich *et al.*, 2010). Dieser scheint jedoch nicht eine physiologische Expression des murinen CXCR7-Antigens detektieren zu können, weshalb auf murinen Leukozyten bisher keine CXCR7-Oberflächenexpression nachgewiesen werden konnte. Lediglich der Nachweis von CXCR7 RNA-Transkripten ließ eine CXCR7 Expression in murinen B-Zellen, NK-

Zellen und einigen T-Zellsubpopulationen vermuten (Sierro *et al.*, 2007). In der Arbeit wurde daher die CXCR7-Protein Expression in murinen und humanen T-Zellen bzw. Thymozyten unter Verwendung des CXCR7-Antikörper Klon 11G8 in der Durchflusszytometrie und unter Verwendung eines neuen polyklonalen anti-Maus/ Human CXCR7 Antikörpers im Westernblot näher analysiert.

Während in murinen Thymozyten nur geringe CXCR7 Expressionslevel nachweisbar waren, konnten sowohl in murinen, als auch in humanen aktivierten peripheren T-Zellen erhöhte CXCR7 Expressionsspiegel festgestellt werden. Physiologisch scheint CXCR7 somit nicht unbedingt Funktionen in der Thymopoese, aber dafür potentiell in aktivierten T-Zellen zu besitzen. NF κ B induzierende Signale werden vermehrt angenommen, eine Expression von CXCR7 in Zellen zu induzieren (Jin *et al.*, 2009; Tarnowski *et al.*, 2010; Tarnowski *et al.*, 2010). So führte die Mutation von NF κ B-Bindungsstellen in der Promotorregion von CXCR7 zu verringerten Promotoraktivitäten *in vitro* (Tarnowski *et al.*, 2010). Da es auch infolge der TCR-Signaltransduktion zur Aktivierung von NF κ B kommt (Weil und Israel, 2006), war es vorstellbar, dass die erhöhte CXCR7 Expression in aktivierten T-Zellen auf TCR-induzierte NF κ B-Signale zurückzuführen ist. In der Arbeit konnte jedoch keine erhöhte CXCR7 Expression in naiven T-Zellen infolge einer Stimulation mit TNF α und IL-1 β beobachtet werden. Demnach scheint die CXCR7 Expression in T-Zellen von einer globaleren Aktivierung, wie sie infolge der TCR-Stimulation auftritt, abhängig zu sein. Allgemein könnte eine hochregulierte CXCR7 Expression in aktivierten T-Zellen erhöhte Adhäsionseigenschaften der Zellen vermitteln. In humanen T-Zellen wurde gezeigt, dass CXCR7 die CXCR4-abhängige Integrinaktivierung verstärkt (Hartmann *et al.*, 2008). Daraus resultierende verstärkte Integrinsignalwege könnten wiederum zur Apoptoseresistenz der T-Zellen infolge der TCR-Aktivierung beitragen (Gendron *et al.*, 2003).

Auffällig war, dass CXCR7 in T-Zellen vor allem durch eine intrazelluläre Lokalisation charakterisiert ist. So war in humanen T-Zellen CXCR7 im Bereich der Plasmamembran, aber auch in Endosomen nachweisbar. Es ist zu vermuten, dass CXCR7 zwischen diesen Kompartimenten, möglicherweise abhängig von posttranslationalen Modifikationen, hin und her pendelt (Hartmann *et al.*, 2008). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass CXCR7 N-Glykosylierungs-abhängige Epitope besitzt, wie sie bereits für die N-terminale Sequenz und die zweite extrazelluläre Schleife von CXCR7 vorhergesagt wurden (Heesen *et al.*, 1998). Glykosylierungen, aber auch andere Proteinmodifikationen könnten die Verteilung von intra-

zellulärem und membranständigen CXCR7-Protein regulieren und somit zum Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen in peripheren T-Zellen beitragen.

Während eine physiologische Expression in murinen Thymozyten kaum detektierbar war, konnten verstärkte Expressionen von CXCR7 sowohl in humanen T-ALL-Zelllinien, als auch in primären humanen akuten lymphoblastischen T-Zellleukämien in der Arbeit nachgewiesen werden. Auch cHL-Zelllinien und HRS-Zellen in primären cHLs wiesen eine hohe CXCR7 Expression auf. Im Gegensatz zu T-ALLs besitzen cHLs in der Regel zwar keinen T-, sondern einen B-Zellursprung, gleichzeitig sind sie jedoch meist durch eine aberrante Expression von B-Zelllinien unspezifischen Genfunktionen charakterisiert (Janz *et al.*, 2006). Bei einigen wenigen cHLs geht man sogar von einem T-Zell-Ursprung aus, da rearrangierte TCR-Gene in den Tumorzellen nachgewiesen werden konnten (Muschen *et al.*, 2000; Seitz *et al.*, 2000). Allgemein ist zu vermuten, dass eine aberrante Überexpression von CXCR7 während der T-Zellentwicklung zur Pathogenese von T-ALLs, aber auch von cHLs beitragen könnte, ähnlich wie es für die Überexpression von CXCR7 in soliden Tumoren beschrieben worden ist (Sun *et al.*, 2010). Auffällig war, dass in murinen Thymozyten die CXCR7 Expression auf RNA-Ebene in den einzelnen Thymozytenstadien ein inverses Expressionsprofil im Vergleich zur CXCR4 Expression aufwies. Dies lässt potentiell eine Differenzierungs-abhängige regulatorische Aktivität von CXCR7 auf CXCR4-vermittelte Signale in der normalen Thymopoese vermuten. Wie die Daten der Arbeit zeigen, scheint eine Koexpression beider Rezeptoren auf Thymozyten zu verstärkten CXCR4-abhängigen Überlebenssignalen zu führen. Hieraus könnte abgeleitet werden, dass CXCR7 überexprimierende Thymozyten erhöhte anti-apoptotische Eigenschaften besitzen und somit putativ empfänglicher für onkogen transformierende Ereignisse sein könnten. Niedrige CXCR7-Expressionslevel auf CXCR4^{hoch} exprimierenden Thymozyten könnten hingegen die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung während der normalen Thymopoese reduzieren.

5.2 Eine konstitutive CXCR7 Expression vermittelt selektive Funktionen in hämatopoetischen Zellpopulationen

Allgemein sind Funktionen von CXCR7 im hämatopoetischen System bisher kaum charakterisiert. In der humanen B-Zellentwicklung konnte gezeigt werden, dass die CXCR7-Proteinexpression im Laufe der Differenzierung von Pro-Prä-B-Zellen im Knochenmark hin zu reifen rezirkulierenden B-Zellen hochreguliert wird (Infantino *et al.*, 2006). Zusätzlich

konnte eine Korrelation zwischen CXCR7 Expression auf Gedächtnis-B-Zellen und deren Fähigkeit, in Plasmazellen zu differenzieren, festgestellt werden. Auch in humanen DCs konnte eine Hochregulation der CXCR7 Expression infolge einer Aktivierung beobachtet werden. Funktionen von CXCR7 in diesen Differenzierungsprozessen sind jedoch nicht bekannt. In humanen T-Zellen wurde zunächst angenommen, dass CXCR7 T-Zellchemotaxis induziert (Balabanian *et al.*, 2005). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass CXCR7 allein keine chemotaktischen Funktionen besitzt (Burns *et al.*, 2006). CXCR7 scheint dagegen eher T-Zellchemotaxis zu unterstützen, indem die CXCR4-induzierte Integrinaktivierung verstärkt wird (Hartmann *et al.*, 2008).

In der Maus sind im Gegensatz zum Menschen bisher keine CXCR7 assoziierten Funktionen beschrieben worden. Es wurde sogar postuliert, dass CXCR7 keine hämatopoetischen Funktionen besitzt, da CXCR7 defiziente Mäuse eine normale fötale Hämatopoese aufweisen (Sierro *et al.*, 2007). Die Hämatopoese im adulten Tier wurde hierbei jedoch nicht näher berücksichtigt. In der Arbeit war es daher zunächst das Ziel gewesen, mehr über hämatopoetische Funktionen von CXCR7 durch Generierung einer konditionellen KO-Maus zu erfahren. Da dieser Ansatz jedoch nicht erfolgreich war, wurde alternativ der Ansatz der retroviralen Überexpression von humanem CXCR7 im hämatopoetischen System gewählt. Dieses Vorgehen erwies sich als vorteilhaft, um potentiell pathogene Konsequenzen einer aberranten Überexpression von CXCR7 in Thymozyten zu identifizieren.

In Übereinstimmung mit dem CXCR7-KO Mausmodell konnte auch in CXCR7 Knochenmarktransfermäusen eine normale B-Zelllymphopoese und Myelopoese festgestellt werden. Lediglich der Anteil an CXCR7 exprimierenden Prä-B-Zellen war im Vergleich zu Kontrolltieren leicht erhöht, wenn auch nicht statistisch signifikant. CXCL12 ist bekannt, Prä-B-Zell Proliferation und Überleben zu stimulieren (Egawa *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 1999; Tokoyoda *et al.*, 2004). Möglicherweise wurden diese Effekte durch die konstitutive CXCR7 Expression verstärkt. Auch ein erhöhter Anteil an erythroiden Vorläuferzellen konnte im Knochenmark von CXCR7-Transfertieren verzeichnet werden, welcher mit der beschriebenen Expression von CXCR7 auf primitiven Erythrozyten in der fötalen Mausleber korrespondierte (Burns *et al.*, 2006). Neben diesen eher geringen Effekten hatte die konstitutive CXCR7 Expression vor allem einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung von T-Zellen. So waren nicht nur signifikant erhöhte Anteile an CXCR7 exprimierenden Thymozyten im Thymus, sondern auch an peripheren T-Zellen in Blut, Milz und Lymphknoten in CXCR7-Transfermäusen zu detektie-

ren. Die signifikant erhöhte Frequenz an $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie war dabei nicht auf einen erhöhten Anteil an $CD4^+$ Thymozyten im Thymus zurückzuführen. Vielmehr könnte eine konstitutive CXCR7 Expression in der Peripherie verstärkt zum Überleben oder zur Proliferation von aktivierten T-Zellen beigetragen haben. Da diese auch physiologisch erhöhte CXCR7 Expressionslevel aufwiesen, ist anzunehmen, dass CXCR7 in diesen Zellen entscheidende Funktionen vermittelt.

Für den erhöhten Anteil an CXCR7 exprimierenden Thymozyten im Thymus von CXCR7 Transfermäusen sind verschiedene Ursachen denkbar. Zum einen könnte CXCR7 eine verstärkte Differenzierung von thymischen Vorläuferzellen (ETPs oder DN1-Zellen), zum anderen aber auch eine verstärkte Migration dieser Zellen in den Thymus bewirkt haben. Tatsächlich war im Knochenmark von CXCR7 Transfermäusen die Frequenz an CLPs im Vergleich zur Kontrolle leicht, wenn auch nicht signifikant erhöht. CLPs wurden seit langem angenommen, Vorläufer von DN1-Zellen zu sein. Neuere Modelle gehen jedoch von früheren Knochenmarkvorläuferzellen wie MPPs (*multipotent progenitor cells*) als Vorstufe zu thymischen Vorläuferzellen aus (Chi et al., 2009; Zlotoff et al., 2008). Da die Frequenz von DN1 Zellen in CXCR7 und Kontrolltransfertiern vergleichbar war, konnte eine erhöhte Differenzierung von thymischen Vorläuferzellen in Anwesenheit von CXCR7 eher ausgeschlossen werden. Chimärismus-Experimente zeigten zusätzlich, dass CXCR7 thymischen Vorläuferzellen keinen Migrationsvorteil in den Thymus verschafft. Dies ist nicht nur auf fehlende chemotaktische Eigenschaften von CXCR7 (Burns *et al.*, 2006), sondern auch auf die CXCL12-Unabhängigkeit dieser Migration zurückzuführen. Während ursprünglich angenommen wurde, dass thymische Vorläuferzellen CXCR4-abhängig in den Thymus einwandern (Aiuti *et al.*, 1997), geht man inzwischen von einer CXCL12-unabhängigen, dafür CCR9 und CCR7-vermittelten Migration aus (Ara et al., 2003; Liu et al., 2005; Wurbel et al., 2001). Der erhöhte Anteil an CXCR7-exprimierenden Thymozyten in CXCR7 Transfermäusen war somit hauptsächlich auf eine effizientere intrathymische Differenzierung zurückzuführen. In Chimärismusexperimenten war diese durch ein schnelleres Erreichen des DP-Stadiums in Anwesenheit von CXCR7 charakterisiert. Im Detail konnte innerhalb der DN-Thymozytenpopulation ein verstärkter DN3-zu-DN4 Übergang identifiziert werden, welcher CXCR4 abhängig ist (Tramont *et al.*, 2010).

Eine konstitutive CXCR7-Expression im hämatopoetischen System schien somit vor allem selektiv einen verstärkenden Effekt auf Differenzierungsprozesse zu haben, in denen CXCR4

Überlebenssignale vermittelt. In der thymischen T-Zellentwicklung könnte dies mit verstärkten anti-apoptotischen Eigenschaften von CXCR4 exprimierenden unreifen Thymozytenstadien assoziiert sein, deren maligne Entartung zur Entstehung von akuten T-Zellleukämien führt. Eine konstitutive CXCR7-Aktivität könnte somit entscheidende Konsequenzen für die Apoptoseresistenz von T-Zellleukämien besitzen.

5.3 CXCR7 ist ein anti-apoptotischer Kostimulator während der thymischen β -Selektion

5.3.1 CXCR7 verstärkt CXCR4 vermittelte Überlebenssignale

In Abhängigkeit von der modulierenden Aktivität von CXCR7 auf CXCR4 vermittelte Funktionen waren unterschiedliche Phänotypen im Thymus von CXCR7 Knochenmarktransfermäusen denkbar gewesen. Die Funktion von CXCR7 als nicht-signaltransduzierender *Decoy*-Rezeptor hätte inhibitorische Effekte auf CXCR4-abhängige Ereignisse ausüben können (Comerford und Nibbs, 2005). Ähnlich wie in *lck-Cre CXCR4^{fl/fl}* Mäusen wäre dann aufgrund einer gestörten CXCR4 Migration eine reduzierte Anzahl an DN3 Zellen in der subkapsulären Zone des thymischen Cortex zu erwarten gewesen (Plotkin *et al.*, 2003). Eine gestörte β -Selektion, charakterisiert durch reduzierte Zahlen an DP Thymozyten und Akkumulation an DN3 Zellen, hätte damit verbunden sein können (Tramont *et al.*, 2010). Dies war in CXCR7 Transfermäusen nicht zu beobachten. Stattdessen konnte CXCR7 als anti-apoptotischer Kostimulator während der thymischen β -Selektion im Komplex mit CXCR4 identifiziert werden. Die Anwesenheit von CXCR7 führte zu einem effizienteren, CXCR4-abhängigen DN3-zu-DN4 Übergang. Dieser war durch eine Akkumulation von DN4-Zellen, durch reduzierte Zahlen an DN2 und DN3 Zellen und durch verringerte Apoptoserate in den Thymozytenstadien DN3 und DN4 charakterisiert. Anschließende Differenzierungsschritte von DP-Thymozyten hin zu einfach positiven Thymozyten in der Medulla waren durch CXCR7 dagegen nicht beeinflusst. Dies mag zum einen darauf zurückzuführen sein, dass DP Thymozyten von dem CXCL12-reichen Cortex CCR7-abhängig in die Medulla einwandern und damit möglicherweise nicht mehr von CXCL12-vermittelten Signalen abhängig sind (Forster *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2004). Zum anderen deutet dieser Befund aber auch darauf hin, dass CXCR7 exprimierende Thymozyten eine normale positive und negative Selektion durchlaufen, die nicht CXCR4 abhängig ist.

CXCR7 könnte auf unterschiedliche Weise zur Verstärkung von CXCR4-vermittelten Überlebenssignalen während der thymischen β -Selektion und damit zu einem effizienteren DN3-zu-DN4 Übergang beitragen. Voraussetzung für eine erfolgreiche β -Selektion ist zunächst, dass DN3-Zellen CXCR4-abhängig in die subkapsuläre Zone des Thymus einwandern. Diese Zone ist neben der hohen CXCL12-Expression auch durch eine Expression von Lamininen, wie Laminin β 1, Laminin 5 und Laminin 10/11 charakterisiert (Griffith et al., 2009; Kim et al., 2000; Kutlesa et al., 2002). Laminine sind extrazelluläre Matrixproteine, die durch Integrinrezeptoren wie den Laminin-5-Rezeptor α 6 β 4 erkannt werden. Dieser Rezeptor wird hoch auf humanen DN Thymozyten exprimiert (Wadsworth et al., 1992). Eine kooperative Signaltransduktion zwischen CXCR4 und Integrinrezeptoren scheint essentiell für die Adhäsion und Differenzierung von Thymozyten zu sein. So führte eine Blockierung der Laminin-5-Rezeptor Signaltransduktion mit Hilfe von anti-Laminin-5 Antikörpern in fötalen thymischen Organkulturen (FTOC) zu einem reduzierten Überleben und zu einer Inhibition der Differenzierung unreifer Thymozyten. Da für CXCR7 in humanen peripheren T-Zellen eine unterstützende Funktion in der CXCR4-abhängigen Integrinaktivierung beschrieben worden ist (Hartmann et al., 2008), war es vorstellbar, dass CXCR7 zum Überleben von DN3 und DN4 Zellen an der subkapsulären Zone durch Verstärkung CXCR4-induzierter Integrinsignale beigetragen haben könnte.

Ferner könnte CXCR7 eine effizientere β -Selektion durch Ausbildung von Heterodimeren mit CXCR4 in DN Thymozyten begünstigen. In SCB.29 Zellen ist gezeigt worden, dass eine CXCL12 Stimulation zur physikalischen Assoziation von präTCR und CXCR4 auf der Membranoberfläche führt (Tramont et al., 2010). Diese Assoziation war verbunden mit verstärkten chemotaktischen Signalen wie erhöhte Calcium-Antworten, eine verstärkte ERK-Phosphorylierung und Aktin-Polymerization. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass CXCR4 und präTCR kooperativ die Expression des anti-apoptotischen Gens *Bcl2-Ad1* induzieren (Mandal et al., 2005; Tramont et al., 2010). Innerhalb der Arbeit konnte eine CXCL12-unabhängige Kollokalisierung zwischen CXCR7 und CXCR4 auf SCB.29 Zellen beobachtet werden. Dies lässt eine Ausbildung von CXCR7-CXCR4 Heterodimeren und damit eine potentielle Integration von CXCR7 in den CXCR4-präTCR-Signaltransduktionskomplex vermuten. Innerhalb dieses Komplexes könnte CXCR7 CXCR4-vermittelte Überlebenssignale durch Rekrutierung von β -Arrestin-Molekülen verstärkt haben. Mehrere Studien hatten eine CXCL12 induzierte Bindung von β -Arrestin 2 Molekülen an den zytoplasmatischen C-Terminus von CXCR7 nachweisen können (Luker et al., 2009; Rajagopal et al., 2010). Da β -

Arrestin 2 Moleküle auch bekannt sind, für die Desensitivierung von CXCR4 durch Vermittlung von Rezeptorinternalisierung verantwortlich zu sein (Krupnick und Benovic, 1998; Vroon et al., 2006), könnte das Wegfangen von β -Arrestin 2 durch CXCR7 zur verstärkten CXCR4 Signaltransduktion beigetragen haben (Zabel *et al.*, 2009). Diese Annahme wird gestützt durch die beobachtete Stabilisierung der CXCR4-Oberflächenexpression auf CXCR7 exprimierenden DN Thymozyten. Keine verstärkte CXCR4-Oberflächenexpression konnte auf CXCR7 transduzierten Knochenmarkvorläuferzellen im Vergleich zu Mock transduzierten Zellen beobachtet werden. Diese Zellen waren jedoch grundsätzlich durch eine sehr hohe CXCR4 Expression charakterisiert, welche möglicherweise nicht zusätzlich durch CXCR7 gesteigert werden konnte. Eine CXCR7 induzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung könnte darüber hinaus eine G α i-unabhängige Aktivierung von ERK1/2 Molekülen bewirkt (Rajagopal *et al.*, 2010) und damit potentiell CXCR4-präTCR induzierte Chemotaxis- und Überlebenssignale verstärkt haben.

Insgesamt kann somit postuliert werden, dass eine konstitutive CXCR7 Expression in DN Thymozyten eine effizientere β -Selektion durch Verstärkung CXCR4-abhängiger Funktionen wie die Stimulation von Überleben und Adhärenz vermittelt. Dies scheint unabhängig von definierten Stromazellnischen im Thymus zu erfolgen, da auch *in vitro* der Effekt von CXCR7 in OP9-DL1 Kokulturen rekapituliert werden konnte.

5.3.2 CXCR7 und CXCR4 induzierte Überlebenssignale wirken kooperativ

Die Daten der Arbeit deuteten mehrfach darauf hin, dass CXCR7 synergistisch mit dem präTCR und CXCR4 Überlebenssignale in Thymozyten vermitteln kann. So wiesen Thymozyten, in denen Apoptose durch Staurosporin oder Bestrahlung induziert wurde, eine erhöhte Apoptoseresistenz in Anwesenheit von CXCR7 auf. Diese war durch eine verringerte Caspase-3 Aktivierung und durch eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl2-A1d charakterisiert. Bcl2-A1d ist bekannt, Caspase-3 induzierte Apoptose zu inhibieren (Mandal *et al.*, 2005).

Physiologisch wird Überleben und Proliferation von Thymozyten während der thymischen β -Selektion durch eine kooperative Signaltransduktion zwischen präTCR und CXCR4 gewährleistet. Hierbei wird angenommen, dass CXCR4 präTCR induzierte Aktivierungssignale

amplifiziert. Auch in peripheren T-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine kooperative Signaltransduktion zwischen CXCR4 und dem TCR zur verstärkten Proliferation und IFN γ Sekretion führt (Molon *et al.*, 2005). Mechanistisch bewirkt CXCR4 im Thymus eine Verstärkung und Verlängerung von präTCR-induzierten MAPK-Signalen, was zur Stabilisierung und Akkumulation von Erk1/2 Effektormolekülen wie c-Fos und c-Myc führt (Kumar *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2004). Insbesondere c-Myc vermittelt im Folgenden die starke Proliferation von DN4-Zellen (Dose *et al.*, 2006). Auch CXCR4 benötigt umgekehrt intakte präTCR-induzierte MAPK-Signalwege, um eine CXCL12 stimulierte Chemotaxis von DN3-Zellen vermitteln zu können. So wiesen *in vitro* DN3-Zellen aus Rag2^{-/-} Mäusen, welche nicht den präTCR exprimieren, Defekte in der CXCL12-vermittelten Chemotaxis auf (Tramont *et al.*, 2010). Ein zentrales Signaltransduktionsmolekül, welches präTCR und CXCR4 vermittelt Signale zu verbinden scheint, ist das Adaptermolekül ShcA. Beide Rezeptoren induzieren die Phosphorylierung von ShcA (Kremer *et al.*, 2003; Patrussi *et al.*, 2007), welches anschließend durch Rekrutierung von Grb2 und SOS Ras/MAPK-Signalwege aktiviert (Zhang *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit könnte CXCR7 diese präTCR/ CXCR4 induzierten MAPK-Signalwege zusätzlich durch β -Arrestin-Bindung verstärkt haben. Wie bereits beschrieben, ist es vorstellbar, dass CXCR7 über die β -Arrestin-Bindung präTCR unabhängig MAPKs aktiviert oder auch eine verlängerte CXCR4 Signaltransduktion durch verminderte Rezeptor-Desensitivierung vermittelt. Infolge dessen könnte es zur Überexpression von c-Fos und c-Myc kommen, was den effizienteren DN3-zu-DN4-Übergang in CXCR7 retrogenen Mäusen erklären würde (Abb. 53). Auch die erhöhte Expression des *Bcl2-A1d* Gens in CXCR7 exprimierenden Thymozyten lässt eine verstärkte CXCR4-abhängige Signaltransduktion in Anwesenheit von CXCR7 vermuten. Der präTCR vermittelt das Überleben von DN Thymozyten während der thymischen β -Selektion vor allem durch die Induktion der Expression des anti-apoptotischen Gens *Bcl2-A1d*. So ist eine Herunterregulation der *Bcl2-A1d* Expression in Thymozyten mit erhöhten Apoptoseraten in Anwesenheit funktioneller präTCRs verbunden (Mandal *et al.*, 2005). Abhängig ist die Induktion der *Bcl2-A1d* Expression von CXCR4 induzierten NF κ B-Signaltransduktionswegen (Tramont *et al.*, 2010). Deren Aktivierung wird wiederum angenommen, von CXCR4-abhängigen PI3-Kinase Signalwegen abhängig zu sein (Ahamed und Madhivadhani, 2010; Janas *et al.*, 2010). Eine verlängerte Aktivität von CXCR4 induzierten NF κ B Signalen in Anwesenheit von CXCR7 könnte somit in einer Überexpression von *Bcl2-A1d* resultieren. Zusätzlich scheint CXCR7 aber auch in der Lage zu sein, weitere anti-apoptotische Moleküle der Bcl2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-xL zu induzieren. Diese

werden normalerweise nicht CXCR4-abhängig beim Übergang vom DN3 in das DN4-Stadium hochreguliert (Tramont *et al.*, 2010). In Anwesenheit von CXCR7 wäre es jedoch denkbar, dass verstärkte CXCR4-induzierte Akt-Signaltransduktionswege die Expression von Bcl-xl und Bcl2 erhöhen (Jones *et al.*, 2000; Juntilla und Koretzky, 2008; Veis *et al.*, 1993). Allgemein scheint somit eine Überexpression von CXCR7 potentiell mit einer Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2 Molekülen wie Bcl2-A1d, Bcl-2 und Bcl-xL assoziiert zu sein. Während der normalen Thymopoese würden unreife Thymozyten infolgedessen eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen erhalten. Dies könnte die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung durch onkogene Ereignisse erhöhen.

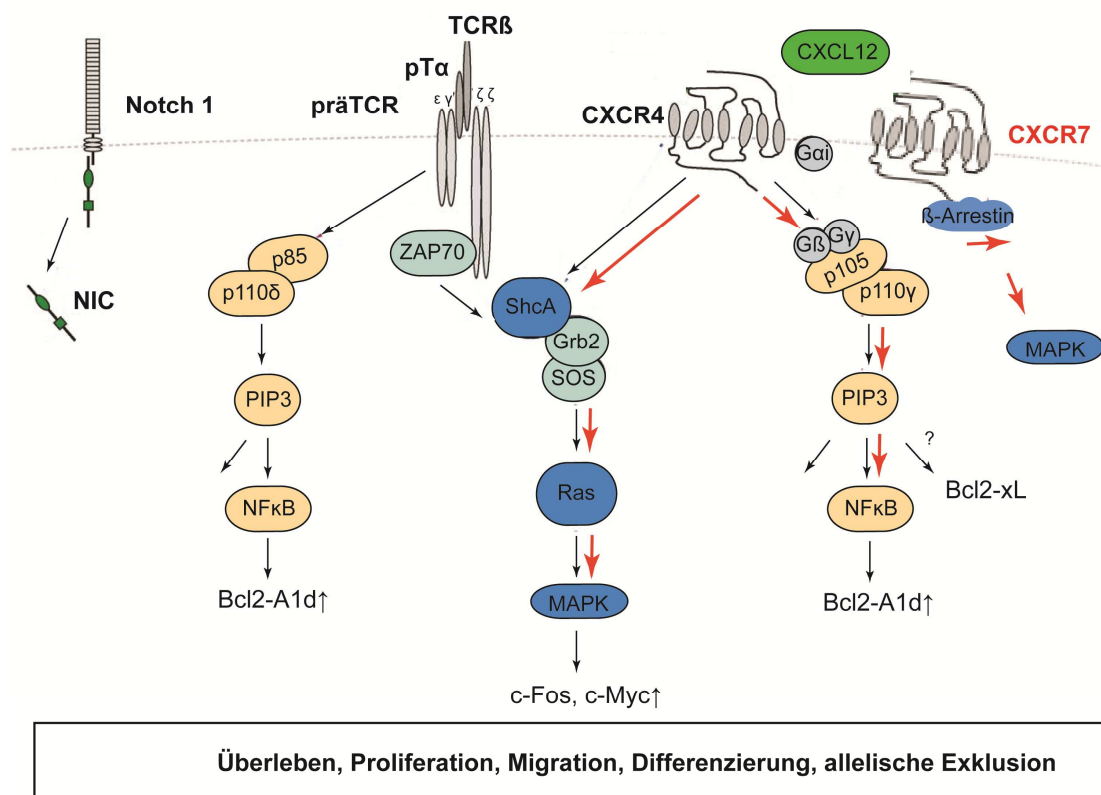


Abb. 53: Modell für die kooperative Signaltransduktion zwischen CXCR7, präTCR, CXCR4 und Notch 1 während der thymischen β -Selektion Durch Verstärkung von CXCR4-induzierten MAP-Kinase, PI3-Kinase und NF κ B Signalwegen könnte CXCR7 eine erhöhte Expression von Bcl-2-A1d, Bcl-xL, Bcl-2, c-Fos und c-Myc in DN3 Thymozyten vermitteln. Daraus resultierende Überlebens-, Proliferations- und Migrationsvorteile könnten eine effizientere thymische β -Selektion begünstigen. NIC, Notch-intrazelluläre Domäne; PIP3, Phosphatidylinositol-3-Phosphat; ZAP70, Zetaketten-assoziierte Proteinkinase 70; Shc, src homology 2 containing; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2 (Modifiziert nach Janas und Turner, 2010).

5.4 CXCR7 und die Entwicklung von T-Zellleukämien

Für CXCR7 sind zahlreiche Funktionen in der Pathogenese von humanen soliden Tumoren beschrieben worden (Sun *et al.*, 2010). Auf RNA Ebene weist CXCR7 ein verbreitetes Expressionsprofil in diversen Geweben auf (Burns *et al.*, 2006). Auf Proteinebene wird CXCR7 dagegen vor allem physiologisch in der Embryonalentwicklung (Burns *et al.*, 2006; Dambly-Chaudiere *et al.*, 2007; Valentin *et al.*, 2007) und aberrant in Tumoren exprimiert (Burns *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Diese aberrante Expression ist mit tumorpathogenen Funktionen wie die Stimulation von Tumorzellüberleben, Proliferation und Adhäsion, aber auch Angiogenese verbunden. In hämatopoetischen Neoplasien sind Expression und potentiell damit assoziierte pathogene Funktionen von CXCR7 bisher kaum bekannt. In pädiatrischen AMLs konnte vor kurzem eine Assoziation zwischen CXCR7-Expression und einer Haut-spezifischen Metastasierung festgestellt werden (Faaij *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde in CXCR7-exprimierenden AML-Zelllinien gezeigt, dass eine CXCR7 Stimulation zur Aktivierung von Akt und Erk1/2 Signaltransduktionswegen führt (Tarnowski *et al.*, 2010). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte nun eine Expression von CXCR7 in humanen T-Zellleukämien und Hodgkin-Lymphomen sowohl in Zelllinien, als auch in primären humanen Tumoren identifiziert werden. Da murine Thymozyten durch eine negative oder sehr geringe CXCR7 Expression charakterisiert waren, ist anzunehmen, dass CXCR7 in humanen T-Zellleukämien, vergleichbar mit der Situation in soliden Tumoren, aberrant überexprimiert wird. Diese Überexpression könnte zusammen mit der im murinen Überexpressionsmodell identifizierten Funktion von CXCR7 als Kostimulator zu CXCR4 eine verstärkte Proliferation und ein verbessertes Überleben von DN Thymozyten begünstigen. Auch primär onkogen transformierte T-Zellen könnten diesen Mechanismus nutzen. Allgemein könnte daraus eine beschleunigte Entwicklung von T-Zellleukämien resultieren.

Die meisten humanen T-Zellleukämien sind durch eine aberrante Notch-Aktivität charakterisiert (Weng und Aster, 2004). Physiologisch wird Notch 1 essentiell für die thymische β -Selektion benötigt (Ciofani *et al.*, 2004; Maillard *et al.*, 2006). Durch Induktion der Expression der pT α -Kette ermöglicht Notch 1 die kooperative Signaltransduktion zwischen präTCR und CXCR4 und vermittelt damit Überleben, Proliferation und weitergehende Differenzierung von DN3-Thymozyten. In der normalen Thymopoese kommt es infolge präTCR induzierter Signaltransduktionswege durch Hochregulation des E2A Inhibitors Id3 zur Herunterregulation der Notch 1 Transkription (Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009). Dies ist absolut erforderlich, da hohe Notch-Expressionen nach erfolgter β -Selektion häufig mit onkogenen Ereignissen verbunden

sind. Eine aberrante Notch-Aktivität wird angenommen, präTCR induzierte Überlebenssignale zu verstärken und damit eine maligne Transformation zu begünstigen. So konnte z.B. in Thymozyten von Notch 3-IC transgenen Mäusen, welche aufgrund der konstitutiven Expression der intrazellulären Domäne von Notch 3 T-Zelllymphome entwickeln, eine erhöhte präTCR-induzierte Erk1/2 und NFκB-Aktivität festgestellt werden (Bellavia et al., 2000; Talora et al., 2003). Allgemein wird angenommen, dass die kooperative Signaltransduktion zwischen Notch und präTCR zu onkogenen Expressionen führt. Beispiele sind die verstärkte Expression von c-Myc (Weng *et al.*, 2006), die verstärkte NFκB-abhängige Expression von Bcl2-A1d (Mandal et al., 2005; Vilimas et al., 2007) und die verringerte Expression des negativen PKB/Akt-Regulators PTEN (Palomero *et al.*, 2007). Insbesondere die konstitutive Akt-Signaltransduktion ist ein allgemeines Merkmal von humanen T-ALLs (Zhao, 2010).

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass eine verstärkte Expression von CXCR7 in ähnlicher Weise wie Notch zu einer erhöhten Proliferation und Apoptoseresistenz von unreifen Thymozyten vor Erreichen der CD4 und CD8 Expression beitragen könnte. CXCR7 könnte durch Verstärkung CXCR4-abhängiger Akt, NFκB und Erk1/2-Signalwege maßgeblich in der onkogenen Expression, z.B. von Bcl2-A1d oder von c-Myc, involviert sein. Allgemein ist es vorstellbar, dass eine Überexpression von CXCR7 unreife Thymozyten empfänglicher für Überlebens- und Proliferationssignale macht. Daraus könnte eine erhöhte genomische Instabilität resultieren, die die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer T-Zellleukämie durch sekundäre genetische Ereignisse erhöhen könnte. Sekundäre transformierende Ereignisse könnten z.B. virale Infektionen wie die HTLV-1 Infektion in adulten T-Zellleukämien (ATL) sein. In ATLs codiert das humane T-Zellleukämie Virus Typ 1 (HTLV-1) das Onkoprotein Tax, welches NFκB-abhängig die Expression von PTEN herunterreguliert (Fukuda *et al.*, 2009). Die daraus resultierende Verstärkung von Akt-Signalwegen trägt entscheidend zur Entstehung von ATLs bei (Ikezoe, T. et.al. 2007). In HTLV-1 immortalisierten T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Tax-induzierte Expression von CXCR7 mit einem verstärkten Wachstum und Überleben der Zellen verbunden ist (Jin *et al.*, 2009). Möglicherweise bewirkt CXCR7 kooperativ mit CXCR4 eine Verstärkung von anti-apoptotischen Akt- und Erk1/2 Signaltransduktionswegen (Kawaguchi *et al.*, 2009). CXCR7 könnte somit entscheidend in die Immortalisierung HTLV-1 infizierter T-Zellen involviert sein.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick I

Zusammengefasst konnte innerhalb der Arbeit eine integrierte, ko-stimulatorische Funktion von CXCR7 im Signaltransduktionskomplex mit CXCR4 und dem präTCR während der thymischen β -Selektion identifiziert werden. Darauf basierend kann angenommen werden, dass eine verstärkte Expression von CXCR7 während der Thymopoese DN Thymozyten empfänglicher für die Entwicklung von T-ALLs macht. Um diese Hypothese überprüfen zu können, sollte zum einen mechanistisch der Einfluß von CXCR7 auf CXCR4-präTCR induzierte Signaltransduktionswege detaillierter aufgeklärt werden. Zum anderen fehlt bis jetzt ein direkter Nachweis, dass CXCR7 zum Überleben und Wachstum von T-Zellleukämien beiträgt. Auch sollte geklärt werden, ob CXCR7 in humanen T-Zellleukämien im Vergleich zu humanen unreifen Thymozytenstadien tatsächlich überexprimiert vorliegt.

Um mechanistisch mehr über CXCR7 induzierte Signaltransduktionswege in DN Thymozyten erfahren zu können, wäre es sinnvoll, eine stabil CXCR7-exprimierende SCB.29 Zelllinie zu generieren. Diese könnte in Stimulationsexperimenten verwendet werden, um die Aktivierung von Akt, MAPK und NF κ B Signaltransduktionswegen im Vergleich zu CXCR7 negativen SCB.29 Zellen analysieren zu können. Auch die Expression potentiell onkogener Effektormoleküle wie Bcl2-A1d, Bcl-2, Bcl-xL und c-Myc könnte in Abhängigkeit von CXCR7 in Westernblot Analysen studiert werden. In der Arbeit korrelierten erhöhte c-Myc Expressionslevel in T-ALL Zelllinien, aber auch in murinen aktivierten T-Zellen mit einer erhöhten CXCR7 Expression. Es wäre interessant zu wissen, ob zwischen beiden Expressionen ein Zusammenhang besteht. Zusätzlich sollte eine CXCR7-abhängige Rekrutierung von β -Arrestin in SCB.29 Zellen oder auch in primären humanen bzw. murinen T-Zellen verifiziert werden. In der Arbeit wird die β -Arrestin-Rekrutierung durch CXCR7 als zentraler Mechanismus angenommen, über den CXCR7 CXCR4-induzierte Signaltransduktionswege in DN Thymozyten verstärkt haben könnte. In Thymozyten oder in T-Zellen ist bisher jedoch keine CXCR7-abhängige β -Arrestin-Rekrutierung nachgewiesen worden. Darüber hinaus wäre es sinnvoll zu überprüfen, ob eine Blockierung von CXCR7 durch Verwendung von CXCR7 spezifischen siRNAs oder chemischen Antagonisten einen reversen Effekt auf potentiell *in vitro* identifizierte CXCR7-Funktionen besitzt.

Für den Nachweis pathogener Eigenschaften von CXCR7 in akuten T-Zellleukämien wären verschiedene Ansätze denkbar. Zunächst könnte überprüft werden, ob eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von CXCR7 in humanen T-ALL Zelllinien mit erhöhten Apoptoseraten

verbunden ist. Auch eine Behandlung der Zelllinien mit dem CXCR7 Antagonisten CCX733 in CXCL12-Stimulationsexperimenten könnte Informationen über anti-apoptotische Eigenschaften von CXCR7 liefern. *In vivo* könnten CXCR7 Antagonisten in T-ALL Mausmodellen eingesetzt und der Einfluss auf Wachstum und Überleben der Leukämiezellen überprüft werden. Zum Beispiel konnte in *Tall/Ink4a/Arf^{+/-}* leukämischen Mäusen vor kurzem gezeigt werden, dass eine kombinierte Behandlung mit dem Akt-Inhibitor Rapamycin und mit Notch-inhibierenden γ -Sekretase-Inhibitoren synergistisch das Wachstum der T-ALLs reduziert (Cullion *et al.*, 2009). Hier wäre es interessant zu wissen, ob CXCR7-Antagonisten zusätzlich diesen Effekt verstärken könnten. Zunächst müsste jedoch grundlegend eine Expression von CXCR7 auf Leukämiezellen in T-ALL-Mausmodellen verifiziert werden. Allgemein könnte CXCR7 durch eine Identifikation von tumorpathogenen Funktionen in akuten T-Zellleukämien zusammen mit Notch und dem präTCR zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für T-ALLs werden.

Analyse CCR7 vermittelter Mechanismen der E μ -Myc Lymphomzell-dissemination in sekundäre lymphatische Organe

5.6 CCR7 und die Positionierung von Lymphomzellen in Stromazell-nischen sekundärer lymphatischer Organe

Homöostatische Chemokinrezeptoren wie CCR7, CXCR4 und CXCR5 werden mit der Organ-spezifischen Metastasierung solider Tumore und Dissemination hämatopoetischer Neoplasien in Zusammenhang gebracht. Ein Beispiel hierfür ist die CXCR4 vermittelte Einwanderung von metastasierten Brustkrebszellen in regionale Lymphknoten (Muller *et al.*, 2001), aber auch die CXCR4 abhängige Dissemination von Multiplen Myelomzellen in das Knochenmark (Moller *et al.*, 2003). Die biologischen Konsequenzen dieser Chemokinrezeptor-vermittelten Einwanderung von Tumorzellen in lymphatische Organe sind bisher nur teilweise geklärt. Mehrere klinische Studien hatten in den vergangenen Jahren eine Korrelation zwischen CCR7-Expression und einer Dissemination von Lymphomzellen in sekundäre lymphatische Organe ergeben. Ein direkter Nachweis für die CCR7-Abhängigkeit der Lymphomzell-dissemination im Mausmodell hatte jedoch gefehlt. Zusätzlich war es unklar, ob CCR7 neben

der Vermittlung der Lymphomzellmigration in diese Organe auch direkten Einfluss auf die Lymphomentwicklung ausübt.

Um diese Fragen näher beantworten zu können, war in der Arbeitsgruppe ein genetisch-definiertes Mausmodell durch Kreuzung des E μ -*Myc* transgenen Mausstammes mit CCR7 defizienten Mäusen generiert worden. In diesem Mausmodell konnte eindeutig gezeigt werden, dass CCR7 nicht nur die Dissemination der Lymphomzellen in Milz und Lymphknoten vermittelt, sondern auch eine entscheidende Rolle in anschließenden Schritten der Lymphomprogression besitzt. So war zunächst die Abwesenheit von CCR7 in E μ -*Myc* transgenen Mäusen durch ein verzögertes Eintreten der spontanen Lymphomerkrankung charakterisiert. Auch Empfänger-mäuse von CCR7 defizienten Lymphomzellen in Transfer-Mausmodellen, die einen genaueren Vergleich der Wachstumskinetik erlaubten, waren durch ein verlängertes Ausbleiben der Krankheit und durch ein reduziertes Tumorwachstum gekennzeichnet. Die CCR7-Abhängigkeit der Lymphomzelldissemination in lymphatische Organe wurde in durchflusszytometrischen Analysen von E μ -*Myc*-Transfermäusen deutlich. So wiesen Empfänger-mäuse von CCR7 defizienten Lymphomzellen eine stark verringerte Tumorzahl in Blut und Milz und kaum Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark auf. Allgemein wird angenommen, dass für die Einwanderung von zirkulierenden Lymphozyten in den Lymphknoten neben CCR7 auch CD62L (L-Selektin) essentiell für die Adhäsion und transendotheliale Migration an HEVs benötigt wird (Ley *et al.*, 2007). Da eine CD62L Expression durchgehend auf Wt und CCR7^{-/-} E μ -*Myc* Zellklonen nachgewiesen werden konnte, war die verringerte Anzahl an CCR7 defizienten Lymphomzellen in Lymphknoten von E μ -*Myc* Transfermäusen somit allein auf die CCR7 Defizienz zurückzuführen. CCR7 scheint folglich der entscheidendere Faktor für die Einwanderung von Lymphomzellen in Lymphknoten zu sein.

Auch in der Milz wurde die CCR7-Abhängigkeit für die Migration von Lymphomzellen in die weiße Pulpa deutlich. Während Wt Lymphomzellen bereits am Tag 6 nach Transfer in der weißen Pulpa lokalisiert werden konnten, waren CCR7^{-/-} Lymphomzellen auch am Tag 10-13 nach Transfer vollständig von der weißen Pulpa ausgeschlossen. CCR7 defiziente E μ -*Myc* Zellen traten deutlich verzögert und in stark reduzierter Anzahl im Vergleich zu Wt Zellen in der weißen Pulpa auf. Wt Lymphomzellen schienen demnach gegenüber CCR7 defizienten Lymphomzellen einen Migrations- bzw. Überlebensvorteil in der weißen Pulpa aufzuweisen.

Innerhalb der weißen Pulpa konnte gezeigt werden, dass CCR7 für eine spezifische Positionierung der Lymphomzellen in Stromazellnischen der T-Zellzone verantwortlich ist. Während

CCR7^{-/-} E μ -Myc Lymphomzellen von der T-Zellzone ausgeschlossen wurden, waren die Wt-Lymphomzellen innerhalb der T-Zellzone im engen Kontakt zu CCL19/ CCL21 produzierenden Stromazellpopulationen, gp38⁺ FRCs und DCs, lokalisiert (Link et al., 2007; Luther et al., 2002; Nolte et al., 2003). Innerhalb dieser Stromazellnischen schienen Wt-Lymphomzellen, welche signifikant weniger apoptotisch als CCR7^{-/-} Lymphomzellen waren, durch reziproke Interaktionen mit den Stromazellen entscheidende Überlebenssignale zu erhalten. Eine vergleichbare Situation wird auch für Leukämiezellen im Knochenmark angenommen. Durch den engen Kontakt mit Stromazellen in Stromazellnischen des Knochenmarks erhalten Leukämiezellen vermutlich Adhäsionskontakte, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die das Überleben der Leukämiezellen vermitteln. Zum Beispiel sind Stromazell-exprimierte Faktoren wie die Wachstumsfaktoren Igf-1, Fgf und VEGF, das Zytokin BAFF und das Adhäsionsmolekül VCAM-1 beschrieben worden, das Wachstum von hämatopoetischen Neoplasien im Knochenmark zu begünstigen (Ayala et al., 2009; Callan und Milne, 2009; Hall et al., 2004; Lwin et al., 2009).

Für die E μ -Myc-Lymphomzellen konnte ein Chemokinrezeptorexpressionsprofil festgestellt werden, welches dem Differenzierungs- und Reifungsgrad ihres physiologischen Gegenparts, d.h. unreife Pro-/Prä-B-Zellen, entsprach (Bowman *et al.*, 2000). Die vor allem auffallende CXCR5 Defizienz schien für die fehlende Rekrutierung der B-Lymphomzellen in die B-Zell-Follikel von Milz und Lymphknoten verantwortlich zu sein. Zusätzlich war CXCR4, ein weiterer wichtiger *Homing*-Rezeptor für follikuläre B-Zellen, nicht in der Lage, die CXCR5-Defizienz zu kompensieren (Allen et al., 2004; Ansel et al., 2000; Forster et al., 1996). Im Lymphknoten wird CXCL12 innerhalb der dunklen Zone von B-Zellfollikeln, aber auch durch HEV-assoziierte Zellen exprimiert (Allen et al., 2004; Okada et al., 2002). In der Milz wurde eine CXCL12 mRNA-Expression zusätzlich in der roten Pulpa und in Marginalzonen-Brückenkanälen nachgewiesen (Hargreaves *et al.*, 2001). Es besteht daher die Möglichkeit, dass in Abhängigkeit von lokalen CXCL12 Konzentrationen in der Milz CCR7 defiziente Lymphomzellen über CXCR4 in der roten Pulpa verbleiben, anstatt CCR7 abhängig in die T-Zellzone einzuwandern.

5.7 CCR7 induziert Tumorzell-intrinsische Überlebenssignale

Die T-Zellzonen-spezifische Lokalisation von Wt E μ -Myc Lymphomzellen war im Vergleich zu CCR7 defizienten Lymphomzellen, die nicht in diese Zone einwandern können, mit einem

signifikanten Überlebensvorteil assoziiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CCR7 zu diesem Überlebensvorteil beiträgt, indem der Rezeptor zum einen Tumorzell-intrinsische Überlebenssignale weiterleitet, und zum anderen die Tumorzellen in wachstumsfördernde Stromazellnischen der T-Zellzone positioniert. CCR7 induzierte Signaltransduktionswege sind insbesondere für Lymphozyten bisher nur teilweise charakterisiert. In HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von CCR7 durch CCL19 und CCL21 zur Aktivierung der PKB/ Akt, aber auch zur Induktion von β -Arrestin-abhängigen MAP-Kinase Signalwegen führt (Kohout et al., 2004; Otero et al., 2008). Die CCL19 und CCL21 induzierten Signaltransduktionswege sind dabei nicht identisch. So vermittelt CCL19 eine stärkere Rezeptorphosphorylierung am C-terminalen Ende durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen und bewirkt dadurch eine schnelle, β -Arrestin vermittelte Endozytose des Rezeptors, CCL21 dagegen nicht (Otero et al., 2008).

Auch in der murinen prä-B-Zelllinie 300-19 und in primären humanen B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die CCR7-Stimulation zur Aktivierung von Erk1/2 MAP-Kinasen führt, die an der Vermittlung von Überlebenssignalen beteiligt sind (Badr et al., 2005; Otero et al., 2008). Zusätzlich induziert CCR7 über die Rekrutierung von Januskinasen wie die Jak2 Tyrosinkinase JAK-STAT-Signaltransduktionswege in B Lymphozyten, die ebenso als anti-apoptotisch beschrieben worden sind (Stein et al., 2003). Die CCR7 vermittelte Aktivierung von PKB/ Akt, I κ B α und RhoA-abhängigen Signalwegen scheint dagegen eher für die B-Zellchemotaxis essentiell zu sein (Badr et al., 2005).

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von CCR7 durch CCL19 und CCL21 zur Aktivierung der PKB/ Akt-Signaltransduktion sowohl in primären murinen B-Lymphozyten aus der Milz, als auch in E μ -Myc B-Lymphomzellen aus transgenen Mäusen führt. Es konnten dabei keine Unterschiede für die CCL19 und CCL21 Stimulation festgestellt werden. CCR7 defiziente B-Lymphozyten und Lymphomzellen wiesen ebenfalls eine konstitutive Akt-Phosphorylierung auf, die jedoch nicht infolge der CCR7-Stimulation gesteigert werden konnte. Dies deutete daraufhin, dass auch andere Signaltransduktionswege in den Lymphomzellen zur Aktivierung der Akt-Signaltransduktion führen und CCR7 nur eine Verstärkung dieses Signaltransduktionsweges bewirkt (Johnston et al., 2010; Kawauchi et al., 2009). In zahlreichen soliden Tumoren ist ein konstitutiv aktiver Akt-Signaltransduktionsweg mit einer erhöhten Apoptoseresistenz verbunden (Nicholson und Anderson, 2002). So konnte z.B. für Plattenepithelkarzinome der Kopf-/ Halsregion gezeigt werden, dass die CCR7-

induzierte Akt-Signaltransduktion direkt zum Überleben der Tumorzellen beiträgt (Wang *et al.*, 2008). Dies scheint nicht unbedingt für die E μ -Myc Lymphomzellen zuzutreffen, da in E μ -Myc/ DC-Kokulturen die Zugabe von rekombinantem CCL19 und CCL21 keinen signifikanten Effekt auf das Tumorzellüberleben hatte. Möglicherweise trägt aber die CCR7 induzierte Akt-Signaltransduktion zu verbesserten Migrationseigenschaften von E μ -Myc-Lymphomzellen bei, ähnlich wie es für humane B-Lymphozyten gezeigt worden ist (Badr *et al.*, 2005). Eine verstärkte CCR7-vermittelte Migration der B-Lymphomzellen in wachstumsstimulierende Stromazellnischen der T-Zellzone könnte somit indirekt zum Überleben der Lymphomzellen beitragen.

In der Arbeit konnte neben der Akt-Aktivierung auch eine CCR7-abhängige Stat3-Aktivierung in E μ -Myc-Lymphomzellen und in B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Stat3 ist ein Transkriptionsfaktor der Stat-Proteinfamilie, die in zahlreichen biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Entzündung und Apoptose entscheidend involviert ist (Yu *et al.*, 2009). Unter normalen Bedingungen ist die Stat3 Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Chemokine schnell und transient. In zahlreichen humanen soliden, aber auch hämatopoetischen Tumoren liegt Stat3 dagegen konstitutiv aktiv vor. In hämatopoetischen Tumoren wie akuten und chronischen Leukämien, sowie im Multiplen Myelom vermittelt Stat3 durch Hochregulation der Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-xL, Bcl-2 und Mcl-1 und Suppression des Tumorsuppressorgens p53 eine Apoptoseresistenz gegenüber Fas- und Chemotherapie-induzierten Apoptosesignalen (Alas und Bonavida, 2001; Alas und Bonavida, 2003; Epling-Burnette *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2005). Auch in E μ -Myc-Lymphomzellen war eine konstitutive Stat3-Aktivierung erkennbar, die durch Stimulation von CCR7 moderat verstärkt werden konnte. Auch hier schienen neben CCR7 andere Signaltransduktionswege für die Stat3-Aktivierung verantwortlich zu sein. Allgemein könnte die CCR7-Signaltransduktion in E μ -Myc Lymphomzellen somit zur Lymphomprogression beitragen, indem zum einen potentiell die Akt-vermittelte Migration in die T-Zellzone begünstigt wird, und zum anderen anti-apoptotische Signalwege wie die Stat3-Signaltransduktion verstärkt werden.

5.8 Reziproke Lymphom-Stromazell Interaktionen vermitteln Lymphomzellüberleben

Neben den CCR7 induzierten Tumorzell-intrinsischen Überlebenssignalen schienen in E μ -Myc Transfermäusen Interaktionen mit DCs und gp38⁺ FRCs im Wesentlichen für das Überleben der Lymphomzellen in der T-Zellzone verantwortlich zu sein. So konnte in *in vitro* Kulturen die Überlebensrate primärer Lymphomzellen durch die Anwesenheit von DCs deutlich erhöht werden. Auch die *in vivo* Depletion von DCs in E μ -Myc Transfermäusen hatte ein signifikant reduziertes Tumorwachstum in sekundären lymphatischen Organen ergeben. Aus den Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass DCs eine Stromazellpopulation darstellen, die entscheidend das Überleben maligner B-Zellen in SLOs kontrolliert.

Dies mag zunächst der bekannten Funktion von DCs in der Stimulation einer anti-Tumor gerichteten T-Zellantwort widersprechen. DCs sind essentiell an der Induktion und Aufrechterhaltung von anti-Tumor Immunantworten beteiligt, indem sie Tumorzellantigene internalisieren, prozessieren und Tumor-spezifischen T-Zellen präsentieren (Lanzavecchia und Sallusto, 2001; Steinman, 2003). Diese Situation liegt in den meisten humanen Tumoren jedoch nicht vor. Anstatt durch die Immunantwort eliminiert zu werden, kommt es zur fortschreitenden Tumorprogression. Es wird angenommen, dass veränderte DC Funktionen in Tumoren hauptsächlich für die defekten T-Zellantworten verantwortlich sind. So führen abnormale Differenzierungen myeloider DCs zu einer verringerten Anzahl reifer, funktionell kompetenter DCs und zur Akkumulation unreifer DCs (Gabrilovich, 2004; Joffre et al., 2009). Diese sind durch eine verringerte Expression an MHC Klasse II und kostimulatorischer Moleküle sowie durch die Produktion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF β charakterisiert. Sie vermitteln die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen und die Ausbildung anergischer T-Zellantworten (Gabrilovich et al., 1996; Huynh et al., 2002; Joffre et al., 2009).

Neben der Induktion einer T-Zelltoleranz könnten DCs aber auch zum malignen Wachstum beitragen, indem sie inflammatorische Zytokine oder Wachstumsfaktoren freisetzen, die als parakrine Überlebensfaktoren das Tumorwachstum begünstigen. Dies wurde in E μ -Myc/ DC-Kulturen deutlich, in denen DC vermittelte Überlebenssignale stark von einer Pertussis-toxin (Ptx)-sensitiven G α i-Signaltransduktion abhängig waren. Dierks *et. al.* hatten bereits zeigen können, dass Stromazell-produzierte Hedgehog-Liganden das Überleben von E μ -Myc-Lymphomzellen vermitteln. Die Identität der involvierten Hedgehog-Liganden und der sie produzierenden Stromazelltypen war dagegen unbekannt (Dierks *et al.*, 2007). Es wurde ver-

mutet, dass FDC produziertes Shh im B-Zellfollikel für das E μ -Myc-Lymphomzellüberleben verantwortlich ist. Diese Annahme stimmte jedoch nicht mit der hier beobachteten T-Zellzonenlokalisation der E μ -Myc-Zellen in Transfermäusen überein. In der Arbeit konnte Ihh als Hedgehogligand identifiziert werden, der durch DCs in der T-Zellzone der Milz exprimiert wird. Zuvor war eine Ihh Expression in lymphatischen Organen nur in humanen Knochenmarkstromazellen bekannt (Kobune *et al.*, 2004). Die inhibitorische Funktion von Ptx in E μ -Myc/ DC-Kokulturen war daher potentiell auf die Funktion von Lymphomzell-exprimiertem Smoothed (Smo) als G-Protein gekoppelter Rezeptor zurückzuführen. So benötigt Smo Ptx-sensitive G α i-Proteine, um Hedgehogsignale weiterleiten zu können (Ogden *et al.*, 2008). Die Bedeutung der Hedgehog-Signaltransduktion für das E μ -Myc-Lymphomzellüberleben wurde vor allem in E μ -Myc/ DC-Kokulturen deutlich, in denen der Smo-Inhibitor Cyclopamin die DC vermittelten Überlebenssignale reduzierte.

Eine Ihh-Expression konnte auch in gp38⁺FRCs nachgewiesen werden, die neben den DCs als zweite Stromazellpopulation entscheidend zur Lymphompathogenese beizutragen scheinen. Da sie die Hauptstromazellpopulation darstellen, die die CCR7-Liganden produziert (Luther *et al.*, 2002), waren FRCs im Wesentlichen für die Rekrutierung der Lymphomzellen in die T-Zellzone und damit für deren Positionierung in die Nähe der DCs verantwortlich. Sie schienen aber auch selbst Überlebenssignale zu vermitteln. So wiesen die Lymphomzellen in E μ -Myc/ gp38⁺FRC-Kokulturen in Anwesenheit der FRCs einen signifikanten Überlebensvorteil auf, der durch Cyclopamin wieder reduziert werden konnte. Auch weitere FRC produzierte parakrine Faktoren wie CCL19, CCL21 und IL-7 könnten neben Ihh zum Überleben der Lymphomzellen beigetragen haben. FRCs vermitteln durch Sezernierung von CCL19 und IL-7 normalerweise das Überleben und die Homöostase naiver T-Zellen (Link *et al.*, 2007). Die gleichen Mechanismen könnten auch die Lymphompathogenese begünstigen. Insbesondere IL-7 ist beschrieben worden, Proliferation und Überleben von leukämischen PräB-Zellen durch Aktivierung von Jak-Stat-Signalwegen zu stimulieren (Sasson *et al.*, 2010; van der Plas *et al.*, 1996).

Darüber hinaus scheinen FRCs auch durch adhärente Zellkontakte in den Lymphomzellen Überlebenssignale zu induzieren. FRCs waren durch eine hohe Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 charakterisiert, welches beschrieben worden ist, für die Bindung und Einwanderung von α 4-Integrin exprimierenden Lymphomzellen in Lymphknoten verantwortlich zu sein (Pals *et al.*, 2007). VCAM-1 ist aber auch bekannt, durch die Bindung seines Integrin-

rezeptors $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) in Rezeptor-exprimierenden Zellen Überlebenssignale zu stimulieren. So trägt die VCAM-1 Expression auf Knochenmarkstromazellen zum Überleben von akuten B-Zellleukämien durch Aktivierung PI-3K abhängiger Überlebenssignalwege bei (Astier et al., 2004; Hall et al., 2004). Da auch E μ -*Myc*-Lymphomzellen das $\alpha 4\beta 1$ -Integrin exprimierten, ist anzunehmen, dass gp38⁺ FRCs VCAM-1-abhängig den Eintritt, die Adhäsion und das Überleben der Lymphomzellen in der T-Zellzone unterstützen könnten. Möglicherweise sind aber auch weitere Adhäsionsmoleküle in diesen Prozessen involviert.

5.9 Lymphomzell-induzierte Veränderungen der Stromazell-zusammensetzung tragen zum Lymphomwachstum bei

Die *in vivo* Depletion von DCs hatte ein stark verringertes Lymphomwachstum in E μ -*Myc* Transfermäusen ergeben. Daraus konnte geschlossen werden, dass in den Lymphom-erkrankten Mäusen DC-Populationen existieren, die die Lymphomprogression möglicherweise durch Inhibition einer effektiven anti-Tumor Immunantwort begünstigen. In zahlreichen spontanen und transplantierten Tumoren sind diverse unreife, immunsupprimierende DC-Populationen beschrieben worden, die durch inflammatorische Zytokine am Ort des Tumors induziert werden können (Joffre et al., 2009). Auch im E μ -*Myc* Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Lymphomzellen durch das Einwandern in die T-Zellzone aktiv die Zusammensetzung der dort lokalisierten DC-Populationen verändern. So waren reife DCs (CD4⁺/CD11c^{hoch}/I-A^{b hoch}), die eine aktive T-Zellantwort gegen die Lymphomzellen induzieren könnten, in E μ -*Myc*-Transfermäusen deutlich reduziert. Gleichzeitig konnte eine Expansion eines putativ regulatorischen DC Subtyps (CD11c^{niedrig}/ I-A^{b niedrig}) beobachtet werden, welcher aufgrund der geringen MHC Klasse II-Molekülexpression eine reduzierte T-Zellaktivierungskapazität besitzen könnte (Gabrilovich, 2004; Liu et al., 2009).

Allgemein haben regulatorische DCs unter physiologischen Bedingungen u.a. die Funktion, Antigen-spezifische Antworten gegen ubiquitäre Proteine wie Selbstantigene, verdaute und inhalierte Antigene sowie Antigene der Darmflora zu verhindern. Unter infektiösen Bedingungen sind sie negative Regulatoren von Immunantworten, um die Gewebszerstörung im Zusammenhang einer exzessiven inflammatorischen Antwort auf ein Pathogen zu begrenzen (Smits et al., 2005). Regulatorische DCs sind in der Regel immature oder semi-mature DCs, die durch inflammatorische Zytokine wie TNF α in Abwesenheit eines Pathogens, so auch am Ort eines Tumors, induziert werden können (Joffre et al., 2009; Lutz und Schuler, 2002). Da

sie den Reifungsprozess nur unvollständig durchlaufen, sind sie vor allem durch geringere Expressionslevel an MHC Klasse II, kostimulatorischen und Th1/ Th2 polarisierenden Molekülen charakterisiert. Hierdurch vermitteln sie die Ausbildung von anergen T-Zellantworten und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Zellen (Sato et al., 2003; Steinman, 2003; Wakkach et al., 2003). Zusätzlich besitzen sie immunsuppressive Eigenschaften durch die Sekretion von IL-10, welches ebenfalls Tregs induziert (Cools et al., 2008; Jonuleit et al., 2000), und durch die Sekretion von NO, das durch Nitrierung von T-Zellrezeptoren Antigen-TCR Interaktionen inhibiert (Nagaraj et al., 2007). Manche DCreg Populationen exprimieren zusätzlich die Enzyme L-Arginase und IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase), die durch den Abbau der Aminosäuren L-Arginin und L-Tryptophan diese für T-Zellen essentiellen Aminosäuren aus der T-Zellmikroumgebung entfernen (Liu et al., 2009; Mellor et al., 2003; Williams et al., 2008).

Der in der Arbeit identifizierte, putativ regulatorische DC-Subtyp in E μ -Myc-Transfermäusen war neben der geringen CD11c und MHC Klasse II Expression durch verringerte CD86 und erhöhte VCAM-1 und CD80 Expressionslevel charakterisiert und ähnelte damit differenzierten regulatorischen DCs in der Milz (Zhang et al., 2004). Diese entstehen im Gegensatz zu anderen DCregs aus reifen DCs, die nach Einwanderung in die Milz durch Interaktion mit Stromazellen in unreife immunsuppressive DCs differenzieren. Ihre Differenzierung ist charakterisiert durch einen Integrin-Isotypwechsel von CD11c nach CD11b. Sie ist abhängig von der Anwesenheit von TGF β und von Interaktionen mit Integrinen und extrazellulären Matrix-Molekülen auf Stromazellen der Milz. Differenzierte regulatorische DCs supprimieren T-Zellantworten hauptsächlich durch Sekretion von IL-10 und NO, welche eine Inhibition der T-Zellproliferation, jedoch nicht der T-Zellaktivierung bewirken, wie es für andere DCregs beschrieben worden ist (Akbari et al., 2001; Corinti et al., 2001; Kubsch et al., 2003; Sato et al., 2003). Es wird angenommen, dass differenzierte DCs in einer negativen Rückkopplungsschleife T-Zellantworten in der späten Phase einer Immunantwort supprimieren, um eine Immunhomöostase aufrechtzuerhalten.

Ursache für die Zunahme an putativ differenzierten DCregs in E μ -Myc Transfermäusen war möglicherweise das gp38⁺FRC-Stromazellnetzwerk, welches in Empfänger-mäusen von E μ -Myc Lymphomzellen signifikant expandiert vorlag. FRCs exprimieren nicht nur hoch den Integrinliganden VCAM-1, sondern sezernieren auch Kollagen und extrazelluläre Matrixproteine (Balogh et al., 2008; Katakai et al., 2004) und könnten somit an der Differenzierung

von reifen DCs in immunsuppressive, differenzierte DCs beteiligt sein. Die Expansion des FRC-Netzwerkes in E μ -Myc Transfermäusen wurde vermutlich durch die LT α Expression der eingewanderten Lymphomzellen induziert. So wird angenommen, dass die LT β R-Signaltransduktion die Differenzierung von FRCs aus mesenchymalen Vorläuferzellen stimuliert, wie es in humanen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen gezeigt worden ist (Ame-Thomas *et al.*, 2007). Da die LT β R-Signaltransduktion auch die Expression von CCL19, CCL21 und VCAM-1 in FRCs reguliert (Dejardin *et al.*, 2002), war es denkbar, dass E μ -Myc-Transfermäuse lokal erhöhte Konzentrationen an CCL19 und CCL21 in der T-Zellzone aufwiesen. Diese könnten in einer positiven Rückkopplungsschleife weitere Lymphomzellen in die T-Zellzone rekrutiert und somit die Lymphomprogression verstärkt haben. Gleichzeitig war es vorstellbar, dass andere Zellpopulationen wie myeloide Suppressorzellen (MDSCs) und Tregs durch die erhöhten Konzentrationen an CCR7 Liganden CCR7-abhängig in die T-Zellzone einwandern und zur Immunsuppression beitragen (Shields *et al.*, 2010). Für beide Zellpopulationen konnte in E μ -Myc-Transfermäusen am Tag 10-13 nach Transfer jedoch keine signifikante Zunahme beobachtet werden, was wahrscheinlich auf das schnelle, äußerst aggressive Wachstum von E μ -Myc-Lymphomen zurückzuführen ist.

Insgesamt wurde aus den Ergebnissen der Arbeit deutlich, dass maligne B-Zellen in der Lage sind, durch reziproke Interaktionen mit Stromazellen in sekundären lymphatischen Organen aktiv die Stromazellzusammensetzung zum eigenen Überlebensvorteil zu verändern. Im E μ -Myc-Mausmodell scheint insbesondere die LT α induzierte Expansion des FRC-Netzwerkes und die damit potentiell assoziierte Induktion von immunsuppressiven regulatorischen DCs die Lymphomprogression voranzutreiben.

5.10 E μ -Myc Lymphomzellen verschaffen sich ein wachstumsförderndes, inflammatorisches Milieu

Die Daten der Arbeit ergaben des Weiteren, dass reziproke Interaktionen zwischen E μ -Myc-Lymphomzellen und DCs der T-Zellzone nicht nur mit einer veränderten Zusammensetzung an DC-Subpopulationen, sondern auch mit einer veränderten Genexpression der DCs assoziiert sind. So wiesen DCs aus Lymphom-erkrankten Mäusen eine verstärkte Expression von Zytokinen auf, die allgemein mit der Ausbildung eines pro-inflammatorischen Milieus verbunden sind. Hochreguliert waren proinflammatorische Zytokine wie IL-1 α , IFN γ und IL-6, aber auch inflammatorische Chemokine wie CCL1 und CCL12. Diese könnten eine wach-

tumsfördernde und potentiell immunprivilegierte Nische für die Lymphomzellen ausbilden, wie es für Hodgkin-Lymphome im Menschen beschrieben worden ist (Kuppers, 2009).

Das pleiotrophe Zytokin IL-1 α ist als zentraler Regulator von Entzündungsantworten bekannt (Apte et al., 2006; Apte und Voronov, 2008). Zum einen induziert es in Stroma- und Immunzellen die Expression anderer pro-inflammatorischer Gene wie z.B. von inflammatorischen Chemokinen, von IL-6 und von iNOS (induzierbare NO-Synthase), zum anderen erhöht es aber auch die Expression von hoch-affinen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Stromazellen und Leukozyten. Beide IL-1 α -abhängigen Effekte könnten in E μ -Myc Transfermäusen eine Infiltration von Leukozytenpopulationen begünstigen haben, welche möglicherweise das Lymphomwachstum verstärken. Zum Beispiel ist es vorstellbar, dass eine CCL1-vermittelte Rekrutierung von Endothelzellen und eine CCL12-abhängige Einwanderung von Monozyten im Wachstum von lymphatischen Gefäßen beteiligt waren (Webster *et al.*, 2006). Auch eine IL-6 induzierte VEGF Expression könnte die Lymphangiogenese unterstützen (Nakahara *et al.*, 2003). IL-6 ist zusätzlich als entscheidender Überlebensfaktor für Multiple Myelomzellen im Knochenmark bekannt (Klein et al., 1989; Nishimoto, 2010; Nishimoto und Kishimoto, 2006). IL-6 wird in hohen Konzentrationen durch Stromazellen im Knochenmark produziert und induziert durch die Aktivierung von Jak-Stat-Proteinen anti-apoptotische Signalwege in Myelomzellen. Möglicherweise stimuliert IL-6 in ähnlicher Weise das Überleben von E μ -Myc Lymphomzellen in SLOs.

Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass eine Hochregulation von IL-1 zusammen mit IFN γ in dendritischen Zellen eine Expression des Enzyms IDO in DCs induzieren und aktivieren kann (Mellor und Munn, 2004). Dies lässt erneut vermuten, dass in E μ -Myc-Transfermäusen potentiell immunsuppressive, IDO-exprimierende DC Populationen entstehen, die durch Reduzierung lokaler L-Tryptophankonzentrationen T-Zellantworten inhibieren (Popov und Schultze, 2008; Williams et al., 2008). Auch die Hochregulation der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf DCs aus tumor-tragenden Mäusen könnte auf die Entstehung immunsuppressiver DCs hindeuten (Driesen *et al.*, 2008). Humane und murine regulatorische DCs können CD25 infolge einer Aktivierung exprimieren, weisen jedoch gleichzeitig keine Expression der IL-2R β -Kette auf, welche für die Weiterleitung IL-2 vermittelter Signale benötigt wird. Stattdessen wird vermutet, dass CD25 positive regulatorische DCs ihre immunsuppressiven Eigenschaften zum einen durch die Expression von IDO und zum anderen durch Sekretion von CD25 vermitteln. Sezerniertes CD25 könnte freies IL-2 in der Mikroumgebung

von T-Zellen abfangen und dadurch T-Zellproliferation inhibieren. Als wesentlich bedeutenderer Marker für regulatorische DCs wurde in den Array-Analysen auch das pleiotrophe Zytokin IL-10 identifiziert, welches in DCs aus tumor-tragenden Mäusen stark hochreguliert war (Liu et al., 2009; McBride et al., 2002; Smits et al., 2005; Zhang et al., 2004). IL-10 besitzt immunsuppressive Eigenschaften, indem es z. B. regulatorische T-Zellen induziert und auf DCs die Expression von MHC Klasse II-Molekülen, von ICAM-1, CD86, CD80 und Th1 Zytokinen wie IL-12 herunterreguliert. Die dadurch verringerte Tumorantigen-Präsentation durch DCs resultiert in anergen T-Zellantworten (Mocellin et al., 2005; Vicari und Trinchieri, 2004).

Die Genexpressionsanalysen ergaben des Weiteren eine erhöhte Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und von VCAM-1 in DCs aus E μ -Myc-Transfermäusen. Insbesondere die erhöhte Igf-1 Produktion der DCs könnte entscheidend zum Überleben der E μ -Myc-Zellen beigetragen haben. Igf-1 ist als Wachstumsfaktor bekannt, der in humanen akuten lymphozytischen B-Zell-Leukämien von Kindern Überlebenssignale stimuliert (Callan und Milne, 2009; Mitsiades et al., 2004; Vorwerk et al., 2002; Whelan et al., 2008). Da auch die E μ -Myc-Zellen eine hohe Igf1-Rezeptorexpression aufwiesen und vom Reifungsphänotyp den akuten lymphozytischen Leukämien entsprachen, ist es nahe liegend, dass DC sezerniertes Igf1 zum Überleben der Lymphomzellen in der T-Zellzone beigetragen haben könnte. Die erhöhte VCAM-1 Expression könnte ähnlich wie bei den FRCs die Ausbildung von engen Adhäsionskontakten zwischen DCs und Lymphomzellen begünstigt haben. Wie bereits beschrieben, sind erhöhte VCAM-1 Expressionslevel vor allem auf differenzierten regulatorischen DCs der Milz nachweisbar (Zhang *et al.*, 2004). Somit deutet auch die erhöhte VCAM-1 Expression auf die Differenzierung von regulatorischen DCs in E μ -Myc-Transfermäusen hin.

Die Genexpressionsanalysen der DCs beinhalteten auch die Analyse verschiedener Zellzyklusregulatoren. Unter diesen erschien die Hochregulation des Transkriptionsfaktors C/EBP β in DCs aus tumor-tragenden Mäusen als besonders interessant. C/EBP β wird im Immunsystem vor allem innerhalb der myeloiden Linie exprimiert und reguliert dort zahlreiche Genfunktionen, die Proliferation und Differenzierung in myeloiden Zellen vermitteln (Nerlov, 2007; Poli, 1998; Ramji und Foka, 2002). Die Expression und Aktivität von C/EBP β wird durch inflammatorische Mediatoren wie LPS, IL-1 und IL-6 stimuliert. Die daraus resultierende C/EBP β -Transkriptionsaktivität induziert wiederum die Expression zahlreicher inflammatorischer Gene, die an der Ausbildung einer Entzündungsantwort beteiligt sind. C/EBP β -

regulierte Zielgene sind z. B. inflammatorische Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 und $\text{TNF}\alpha$, aber auch inflammatorische Chemokine wie CXCL8 , CCL3 und CCL4 und myeloide Wachstumsfaktoren wie G-CSF, GM-CSF und M-CSF. C/EBP β ist somit zusammen mit IL-1 und IL-6 ein zentraler Induktor einer inflammatorischen Immunantwort. Es kann daher vermutet werden, dass C/EBP β in $\text{E}\mu\text{-Myc}$ -Transfermäusen entscheidend mit für die Ausbildung des wachstums-fördernden, pro-inflammatorischen Milieus, welches in SLOs beobachtet werden konnte, verantwortlich war.

5.11 Zusammenfassung und Ausblick II

Innerhalb der Arbeitsgruppe ist es erstmals gelungen, durch die Generierung eines $\text{CCR7}^{-/-}\text{E}\mu\text{-Myc}$ -Mausmodells eine Chemokinrezeptor-vermittelte Lymphomzelldissemination in SLOs *in situ* nachzuweisen. Daraus resultierende pathogene Konsequenzen konnten in der vorliegenden Arbeit mechanistisch näher aufgeklärt werden (Abb.54).

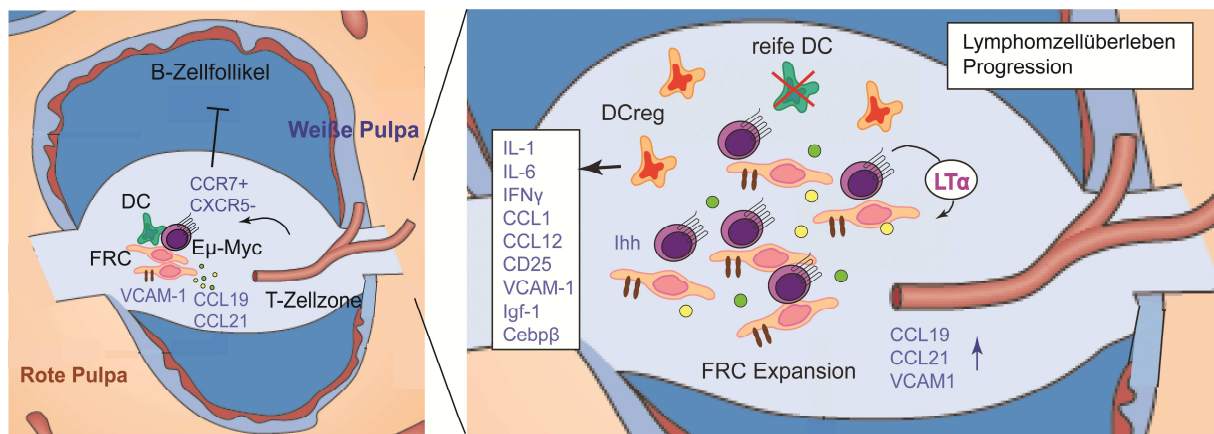


Abb. 54: Modell für $\text{E}\mu\text{-Myc}$ Lymphom – Stromazell Interaktionen in SLOs Links: Wt $\text{E}\mu\text{-Myc}$ Lymphomzellen wandern CCR7 abhängig in die T-Zellzone ein, in der VCAM1+ FRCs die Liganden CCL19 und CCL21 exprimieren. Die CXCR5 Defizienz verhindert eine weitere Einwanderung der Lymphomzellen in den B-Zellfollikel. Rechts: Innerhalb von DC-FRC Stromazellnischen induzieren die $\text{E}\mu\text{-Myc}$ Zellen $\text{LT}\alpha$ -abhängig eine Expansion des FRC Netzwerkes, was zu lokal erhöhten CCL19, CCL21 und VCAM-1 Konzentrationen und damit zur Rekrutierung weiterer Lymphomzellen führt. Die Lymphomzellen erhalten entscheidende Überlebenssignale durch DC und FRC exprimierte Faktoren wie Ihh , Igf1 und VCAM-1. Zusätzlich werden Lymphomzellüberleben und Lymphomprogression durch Induktion immunsuppressiver DCregs, durch die Reduktion reifer, immunaktivierender DCs und durch die Induktion eines proinflammatorischen Milieus gewährleistet. DC, dendritische Zelle; DCreg, regulatorische dendritische Zelle; FRC, fibroblastische retikuläre Zelle; $\text{LT}\alpha$, Lymphotoxin α .

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine CCR7-abhängige Positionierung von $\text{E}\mu\text{-Myc}$ Lymphomzellen in der T-Zellzone durch gp38^+ FRCs vermittelt wird. Daran anschließende reziproke Interaktionen mit T-Zellzonen Stromazellen lieferten den Lymphomzellen entscheidende Überlebenssignale. Dazu gehörten CCR7-induzierte anti-apoptotische Signalwe-

ge, adhärenzte Kontakte zu VCAM-1 exprimierenden FRCs und DCs und sezernierte Überlebensfaktoren wie Ihh und Igf-1. Zusätzlich bewirkten die reziproken Interaktionen eine veränderte Stromazellzusammensetzung, die durch ein expandiertes FRC Netzwerk, durch die Induktion putativ immunsupprimierender DCs und durch ein inflammatorisches Milieu charakterisiert war.

Insgesamt konnte aus den Daten geschlossen werden, dass CCR7 bedeutende Schritte der Lymphompathogenese vermittelt und somit potentiell ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Lymphomtherapien darstellt. Zentraler Mediator der CCR7 vermittelten pathogenen Konsequenzen war vermutlich die LT α Expression der Lymphomzellen. Diese könnte durch Induktion der Differenzierung von FRCs (Ame-Thomas *et al.*, 2007), aber auch durch verstärkte LT β R-Signaltransduktion in bereits vorhandenen FRCs (Dejardin *et al.*, 2002) lokal erhöhte CCL19 und CCL21 Konzentrationen in der T-Zellzone und damit möglicherweise eine verstärkte Rekrutierung von Lymphomzellen bewirkt haben. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte inzwischen gezeigt werden, dass der Transfer von LT α -defizienten Lymphomzellen in Wt-Empfängermäuse oder der Transfer von Wt-Lymphomzellen in LT α -defiziente Mäuse tatsächlich zu einem verringerten Lymphomwachstum aufgrund geringerer CCL19 und CCL21 Expressionen in der Milz führt. Auch eine *in vivo* Inhibition der LT α Signaltransduktion mit Hilfe eines LT β R-Fusionsproteins hatte in E μ -Myc Transfermäusen ein reduziertes Lymphomwachstum ergeben. Die Inhibition der LT-Signaltransduktion stellt somit ein attraktives Ziel zur Behandlung von Lymphomerkrankungen dar.

Ferner führten die Daten der Arbeit zu der Hypothese, dass das expandierte FRC Netzwerk in E μ -Myc Transfermäusen potentiell zur Entstehung von regulatorischen DCs beitragen könnte. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob FRCs in tumortragenden Mäusen Voraussetzungen liefern, damit regulatorische DCs entstehen (Zhang *et al.*, 2004). Zum Beispiel könnte die TGF β -Expression in FRCs aus Tumor-tragenden und Tumor-freien Mäusen überprüft werden. Auch FRC-DC-Kokulturen in An- und Abwesenheit von TGF β wären vorstellbar. Immunsuppressive Eigenschaften CD11c^{int} exprimierender DCs aus E μ -Myc Transfermäusen sollten *in vitro* verifiziert werden. Dies könnte z. B. durch Überprüfung der Expression von immunsuppressiven Mediatoren wie IL-10 und IDO mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Maldonado und von Andrian, 2010; Popov und Schultze, 2008), aber auch durch Kokulturen der DCs mit TCR-transgenen T-Zellen in T-Zell-Aktivierungsexperimenten erfolgen (Zhang *et al.*, 2004).

Des Weiteren sollte die Rolle von zentralen, DC-exprimierten Entzündungsmediatoren wie C/EBP β im Kontext der E μ -*Myc*-Lymphomprogression näher studiert werden. Neben der Rekrutierung inflammatorischer Zellen durch Induktion inflammatorischer Mediatoren (Ramji und Foka, 2002; Rosenbauer und Tenen, 2007) könnte C/EBP β zur Lymphomprogression beitragen, indem der Transkriptionsfaktor direkt die Differenzierung immunsuppressiver DCs vermittelt. Vergleichbares ist für immunsupprimierende MDSCs beschrieben worden, von denen man annimmt, dass sie neben regulatorischen T-Zellen im Wesentlichen für die Inhibition von T-Zellantworten in Tumoren verantwortlich sind (Condamine und Gabrilovich, 2011; Ostrand-Rosenberg und Sinha, 2009). So konnte gezeigt werden, dass MDSC induzierende Zytokine wie IL-6, GM-CSF und G-CSF alle von einer C/EBP β Signaltransduktion abhängig sind (Marigo I. et. al. 2010). Ein Transfer von E μ -*Myc*-Lymphomzellen in Mäuse mit C/EBP β defizienten DCs könnte daher wichtige Informationen über die Funktion von C/EBP β in der Generierung von immunsuppressiven DC-Populationen im Zusammenhang einer Lymphomkrankung liefern.

Literaturverzeichnis

- Adams, J. M.; Harris, A. W.; Pinkert, C. A.; Corcoran, L. M.; Alexander, W. S.; Cory, S.; Palmiter, R. D. und Brinster, R. L. (1985): The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature* (Band 318), Nr. 6046, S. 533-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3906410.
- Aggarwal, B. B. und Natarajan, K. (1996): Tumor necrosis factors: developments during the last decade, *Eur Cytokine Netw* (Band 7), Nr. 2, S. 93-124. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8688493.
- Ahamed, J. A. und Madhivadham, P. (2010): Costimulatory role of CXCR4 with pre-TCR and its crosstalk with PI3K in beta-selection of thymocytes, *Sci Signal* (Band 3), Nr. 119, S. jc4. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20424260.
- Ahr, B.; Denizot, M.; Robert-Hebmann, V.; Brelot, A. und Biard-Piechaczyk, M. (2005): Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 8, S. 6692-700. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15615703.
- Aifantis, I.; Gounari, F.; Scorrano, L.; Borowski, C. und von Boehmer, H. (2001): Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 5, S. 403-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11323693.
- Aifantis, I.; Raetz, E. und Buonomi, S. (2008): Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma, *Nat Rev Immunol* (Band 8), Nr. 5, S. 380-90. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18421304.
- Aiuti, A.; Tavian, M.; Cipponi, A.; Ficara, F.; Zappone, E.; Hoxie, J.; Peault, B. und Bordignon, C. (1999): Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors, *Eur J Immunol* (Band 29), Nr. 6, S. 1823-31. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10382744.
- Aiuti, A.; Webb, I. J.; Bleul, C.; Springer, T. und Gutierrez-Ramos, J. C. (1997): The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood, *J Exp Med* (Band 185), Nr. 1, S. 111-20. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8996247.
- Akbari, O.; DeKruyff, R. H. und Umetsu, D. T. (2001): Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 8, S. 725-31. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11477409.
- Alas, S. und Bonavida, B. (2001): Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs, *Cancer Res* (Band 61), Nr. 13, S. 5137-44. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11431352.
- Alas, S. und Bonavida, B. (2003): Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis, *Clin Cancer Res* (Band 9), Nr. 1, S. 316-26. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12538484.
- Allen, C. D.; Ansel, K. M.; Low, C.; Lesley, R.; Tamamura, H.; Fujii, N. und Cyster, J. G. (2004): Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 9, S. 943-52. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15300245.
- Ame-Thomas, P.; Maby-El Hajjami, H.; Monvoisin, C.; Jean, R.; Monnier, D.; Caulet-Maugendre, S.; Guillaudeux, T.; Lamy, T.; Fest, T. und Tarte, K. (2007): Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis, *Blood* (Band 109), Nr. 2, S. 693-702. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16985173.
- Ansel, K. M.; Ngo, V. N.; Hyman, P. L.; Luther, S. A.; Forster, R.; Sedgwick, J. D.; Browning, J. L.; Lipp, M. und Cyster, J. G. (2000): A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles, *Nature* (Band 406), Nr. 6793, S. 309-14. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10917533.

- Apte, R. N.; Dotan, S.; Elkabets, M.; White, M. R.; Reich, E.; Carmi, Y.; Song, X.; Dvozkin, T.; Krelin, Y. und Voronov, E. (2006): The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions, *Cancer Metastasis Rev* (Band 25), Nr. 3, S. 387-408. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17043764.
- Apte, R. N. und Voronov, E. (2008): Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy?, *Immunol Rev* (Band 222), S. 222-41. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18364005.
- Ara, T.; Itoi, M.; Kawabata, K.; Egawa, T.; Tokoyoda, K.; Sugiyama, T.; Fujii, N.; Amagai, T. und Nagasawa, T. (2003): A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo, *J Immunol* (Band 170), Nr. 9, S. 4649-55. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12707343.
- Astier, A. L.; Svoboda, M.; Hinds, E.; De Beaumont, R.; Munoz, O. und Freedman, A. S. (2004): Integrins regulate survival of pre-B-ALL cells through differential IAP and caspase-7 ubiquitination and degradation, *Leukemia* (Band 18), Nr. 4, S. 873-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14973500.
- Ayala, F.; Dewar, R.; Kieran, M. und Kalluri, R. (2009): Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression, *Leukemia* (Band 23), Nr. 12, S. 2233-41. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19727127.
- Badr, G.; Borhis, G.; Treton, D. und Richard, Y. (2005): IFN α enhances human B-cell chemotaxis by modulating ligand-induced chemokine receptor signaling and internalization, *Int Immunol* (Band 17), Nr. 4, S. 459-67. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15749730.
- Bajenoff, M.; Egen, J. G.; Koo, L. Y.; Laugier, J. P.; Brau, F.; Glaichenhaus, N. und Germain, R. N. (2006): Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes, *Immunity* (Band 25), Nr. 6, S. 989-1001. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17112751.
- Bajenoff, M.; Glaichenhaus, N. und Germain, R. N. (2008): Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone, *J Immunol* (Band 181), Nr. 6, S. 3947-54. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18768849.
- Balabanian, K.; Lagane, B.; Infantino, S.; Chow, K. Y.; Harriague, J.; Moepps, B.; Arenzana-Seisdedos, F.; Thelen, M. und Bachelier, F. (2005): The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 42, S. 35760-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16107333.
- Balogh, P.; Fisi, V. und Szakal, A. K. (2008): Fibroblastic reticular cells of the peripheral lymphoid organs: unique features of a ubiquitous cell type, *Mol Immunol* (Band 46), Nr. 1, S. 1-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18722017.
- Barreiro, O.; Martin, P.; Gonzalez-Amaro, R. und Sanchez-Madrid, F. (2010): Molecular cues guiding inflammatory responses, *Cardiovasc Res* (Band 86), Nr. 2, S. 174-82. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20053659.
- Baudino, T. A.; Maclean, K. H.; Brennan, J.; Parganas, E.; Yang, C.; Aslanian, A.; Lees, J. A.; Sherr, C. J.; Roussel, M. F. und Cleveland, J. L. (2003): Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss, *Mol Cell* (Band 11), Nr. 4, S. 905-14. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12718877.
- Bellavia, D.; Campese, A. F.; Alesse, E.; Vacca, A.; Felli, M. P.; Balestri, A.; Stoppacciaro, A.; Tiveron, C.; Tatangelo, L.; Giovarelli, M.; Gaetano, C.; Ruco, L.; Hoffman, E. S.; Hayday, A. C.; Lendahl, U.; Frati, L.; Gulino, A. und Screpanti, I. (2000): Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice, *EMBO J* (Band 19), Nr. 13, S. 3337-48. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10880446.
- Berahovich, R. D.; Zabel, B. A.; Penfold, M. E.; Lewen, S.; Wang, Y.; Miao, Z.; Gan, L.; Pereda, J.; Dias, J.; Slukvin, II; McGrath, K. E.; Jaen, J. C. und Schall, T. J. (2010): CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes, *J Immunol* (Band 185), Nr. 9, S. 5130-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20889540.
- Bleul, C. C. und Boehm, T. (2000): Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus, *Eur J Immunol* (Band 30), Nr. 12, S. 3371-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11093154.
- Bowman, E. P.; Campbell, J. J.; Soler, D.; Dong, Z.; Manlongat, N.; Picarella, D.; Hardy, R. R. und Butcher, E. C. (2000): Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation, *J Exp Med* (Band 191), Nr. 8, S. 1303-18. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10770798.

- Bradstock, K. F.; Makrynika, V.; Bianchi, A.; Shen, W.; Hewson, J. und Gottlieb, D. J. (2000): Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers, *Leukemia* (Band 14), Nr. 5, S. 882-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10803521.
- Breitfeld, D.; Ohl, L.; Kremmer, E.; Ellwart, J.; Sallusto, F.; Lipp, M. und Forster, R. (2000): Follicular B helper T cells express CXCR4 chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 11, S. 1545-52. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11104797.
- Broxmeyer, H. E. (2008): Chemokines in hematopoiesis, *Curr Opin Hematol* (Band 15), Nr. 1, S. 49-58. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18043246.
- Buonamici, S.; Trimarchi, T.; Ruocco, M. G.; Reavie, L.; Cathelin, S.; Mar, B. G.; Klinakis, A.; Lukyanov, Y.; Tseng, J. C.; Sen, F.; Gehrie, E.; Li, M.; Newcomb, E.; Zavadil, J.; Meruelo, D.; Lipp, M.; Ibrahim, S.; Efstratiadis, A.; Zagzag, D.; Bromberg, J. S.; Dustin, M. L. und Aifantis, I. (2009): CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia, *Nature* (Band 459), Nr. 7249, S. 1000-4. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19536265.
- Burger, J. A.; Burger, M. und Kipps, T. J. (1999): Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells, *Blood* (Band 94), Nr. 11, S. 3658-67. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10572077.
- Burger, J. A.; Tsukada, N.; Burger, M.; Zvaifler, N. J.; Dell'Aquila, M. und Kipps, T. J. (2000): Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1, *Blood* (Band 96), Nr. 8, S. 2655-63. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11023495.
- Burns, J. M.; Summers, B. C.; Wang, Y.; Melikian, A.; Berahovich, R.; Miao, Z.; Penfold, M. E.; Sunshine, M. J.; Littman, D. R.; Kuo, C. J.; Wei, K.; McMaster, B. E.; Wright, K.; Howard, M. C. und Schall, T. J. (2006): A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development, *J Exp Med* (Band 203), Nr. 9, S. 2201-13. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16940167.
- Callan, A. C. und Milne, E. (2009): Involvement of the IGF system in fetal growth and childhood cancer: an overview of potential mechanisms, *Cancer Causes Control*. In Eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19533389.
- Carlsen, H. S.; Haraldsen, G.; Brandtzaeg, P. und Baekkevold, E. S. (2005): Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules, *Blood* (Band 106), Nr. 2, S. 444-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15863780.
- Cheng, Z. J.; Zhao, J.; Sun, Y.; Hu, W.; Wu, Y. L.; Cen, B.; Wu, G. X. und Pei, G. (2000): beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 4, S. 2479-85. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10644702.
- Chi, A. W.; Bell, J. J.; Zlotoff, D. A. und Bhandoola, A. (2009): Untangling the T branch of the hematopoiesis tree, *Curr Opin Immunol* (Band 21), Nr. 2, S. 121-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19269149.
- Ciofani, M.; Schmitt, T. M.; Ciofani, A.; Michie, A. M.; Cuburu, N.; Aublin, A.; Maryanski, J. L. und Zuniga-Pflucker, J. C. (2004): Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation, *J Immunol* (Band 172), Nr. 9, S. 5230-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15100261.
- Ciofani, M. und Zuniga-Pflucker, J. C. (2005): Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 9, S. 881-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16056227.
- Colmone, A.; Amorim, M.; Pontier, A. L.; Wang, S.; Jablonski, E. und Sipkins, D. A. (2008): Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells, *Science* (Band 322), Nr. 5909, S. 1861-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19095944.
- Comerford, I. und Nibbs, R. J. (2005): Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?, *Immunol Lett* (Band 96), Nr. 2, S. 163-74. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15585320.
- Condamine, T. und Gabrilovich, D. I. (2011): Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function, *Trends Immunol* (Band 32), Nr. 1, S. 19-25. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21067974.

- Cools, N.; Van Tendeloo, V. F.; Smits, E. L.; Lenjou, M.; Nijs, G.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. und Ponsaerts, P. (2008): Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells, *J Cell Mol Med* (Band 12), Nr. 2, S. 690-700. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18419605.
- Corinti, S.; Albanesi, C.; la Sala, A.; Pastore, S. und Girolomoni, G. (2001): Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions, *J Immunol* (Band 166), Nr. 7, S. 4312-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11254683.
- Cory, S. (1986): Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation, *Adv Cancer Res* (Band 47), S. 189-234. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3096089.
- Cotton, M. und Claing, A. (2009): G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration, *Cell Signal* (Band 21), Nr. 7, S. 1045-53. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19249352.
- Court, D. L.; Swaminathan, S.; Yu, D.; Wilson, H.; Baker, T.; Bubunenko, M.; Sawitzke, J. und Sharan, S. K. (2003): Mini-lambda: a tractable system for chromosome and BAC engineering, *Gene* (Band 315), S. 63-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14557065.
- Cullion, K.; Draheim, K. M.; Hermance, N.; Tammam, J.; Sharma, V. M.; Ware, C.; Nikov, G.; Krishnamoorthy, V.; Majumder, P. K. und Kelliher, M. A. (2009): Targeting the Notch1 and mTOR pathways in a mouse T-ALL model, *Blood* (Band 113), Nr. 24, S. 6172-81. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19246562.
- Cyster, J. G. (1999): Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs, *Science* (Band 286), Nr. 5447, S. 2098-102. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10617422.
- Cyster, J. G. (2005): Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs, *Annu Rev Immunol* (Band 23), S. 127-59. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771568.
- Cyster, J. G. (2010): B cell follicles and antigen encounters of the third kind, *Nat Immunol* (Band 11), Nr. 11, S. 989-96. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20959804.
- Dambly-Chaudiere, C.; Cubedo, N. und Ghysen, A. (2007): Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1, *BMC Dev Biol* (Band 7), S. 23. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17394634.
- De Togni, P.; Goellner, J.; Ruddle, N. H.; Streeter, P. R.; Fick, A.; Mariathasan, S.; Smith, S. C.; Carlson, R.; Shornick, L. P.; Strauss-Schoenberger, J. und et al. (1994): Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin, *Science* (Band 264), Nr. 5159, S. 703-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8171322.
- De Trez, C. und Ware, C. F. (2008): The TNF receptor and Ig superfamily members form an integrated signaling circuit controlling dendritic cell homeostasis, *Cytokine Growth Factor Rev* (Band 19), Nr. 3-4, S. 277-84. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18511331.
- Dejardin, E.; Droin, N. M.; Delhase, M.; Haas, E.; Cao, Y.; Makris, C.; Li, Z. W.; Karin, M.; Ware, C. F. und Green, D. R. (2002): The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways, *Immunity* (Band 17), Nr. 4, S. 525-35. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12387745.
- Dierks, C.; Grbic, J.; Zirik, K.; Beigi, R.; Englund, N. P.; Guo, G. R.; Veelken, H.; Engelhardt, M.; Mertelsmann, R.; Kelleher, J. F.; Schultz, P. und Warmuth, M. (2007): Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies, *Nat Med* (Band 13), Nr. 8, S. 944-51. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17632527.
- Dimberg, A. (2010): Chemokines in angiogenesis, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 341), S. 59-80. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20373091.
- Dose, M.; Khan, I.; Guo, Z.; Kovalovsky, D.; Krueger, A.; von Boehmer, H.; Khazaie, K. und Gounari, F. (2006): c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression, *Blood* (Band 108), Nr. 8, S. 2669-77. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16788099.
- Driesen, J.; Popov, A. und Schultze, J. L. (2008): CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells, *Immunobiology* (Band 213), Nr. 9-10, S. 849-58. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18926299.

- Egawa, T.; Kawabata, K.; Kawamoto, H.; Amada, K.; Okamoto, R.; Fujii, N.; Kishimoto, T.; Katsura, Y. und Nagasawa, T. (2001): The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor, *Immunity* (Band 15), Nr. 2, S. 323-34. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11520466.
- Epling-Burnette, P. K.; Liu, J. H.; Catlett-Falcone, R.; Turkson, J.; Oshiro, M.; Kothapalli, R.; Li, Y.; Wang, J. M.; Yang-Yen, H. F.; Karras, J.; Jove, R. und Loughran, T. P., Jr. (2001): Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression, *J Clin Invest* (Band 107), Nr. 3, S. 351-62. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11160159.
- Evans, I. und Kim, M. Y. (2009): Involvement of lymphoid inducer cells in the development of secondary and tertiary lymphoid structure, *BMB Rep* (Band 42), Nr. 4, S. 189-93. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19403040.
- Faaij, C. M.; Willemze, A. J.; Revesz, T.; Balzarolo, M.; Tensen, C. P.; Hoogeboom, M.; Vermeer, M. H.; van Wering, E.; Zwaan, C. M.; Kaspers, G. J.; Story, C.; van Halteren, A. G.; Vossen, J. M.; Egeler, R. M.; van Tol, M. J. und Annels, N. E. (2010): Chemokine/chemokine receptor interactions in extramedullary leukaemia of the skin in childhood AML: differential roles for CCR2, CCR5, CXCR4 and CXCR7, *Pediatr Blood Cancer* (Band 55), Nr. 2, S. 344-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20582977.
- Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E. und Berger, E. A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, *Science* (Band 272), Nr. 5263, S. 872-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8629022.
- Finke, D.; Acha-Orbea, H.; Mattis, A.; Lipp, M. und Kraehenbuhl, J. (2002): CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5, *Immunity* (Band 17), Nr. 3, S. 363-73. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12354388.
- Forster, R.; Davalos-Miszlitz, A. C. und Rot, A. (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance, *Nat Rev Immunol* (Band 8), Nr. 5, S. 362-71. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18379575.
- Forster, R.; Mattis, A. E.; Kremmer, E.; Wolf, E.; Brem, G. und Lipp, M. (1996): A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen, *Cell* (Band 87), Nr. 6, S. 1037-47. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8978608.
- Forster, R.; Schubel, A.; Breitfeld, D.; Kremmer, E.; Renner-Muller, I.; Wolf, E. und Lipp, M. (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs, *Cell* (Band 99), Nr. 1, S. 23-33. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10520991.
- Fukuda, R. I.; Tsuchiya, K.; Suzuki, K.; Itoh, K.; Fujita, J.; Utsunomiya, A. und Tsuji, T. (2009): Human T-cell leukemia virus type I tax down-regulates the expression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate inositol phosphatases via the NF-kappaB pathway, *J Biol Chem* (Band 284), Nr. 5, S. 2680-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19047050.
- Gabrilovich, D. (2004): Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects, *Nat Rev Immunol* (Band 4), Nr. 12, S. 941-52. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15573129.
- Gabrilovich, D. I.; Ciernik, I. F. und Carbone, D. P. (1996): Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts, *Cell Immunol* (Band 170), Nr. 1, S. 101-10. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8665590.
- Ganju, R. K.; Brubaker, S. A.; Meyer, J.; Dutt, P.; Yang, Y.; Qin, S.; Newman, W. und Groopman, J. E. (1998): The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 36, S. 23169-75. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9722546.
- Gassmann, P.; Haier, J.; Schluter, K.; Domikowsky, B.; Wendel, C.; Wiesner, U.; Kubitz, R.; Engers, R.; Schneider, S. W.; Homey, B. und Muller, A. (2009): CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo, *Neoplasia* (Band 11), Nr. 7, S. 651-61. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19568410.
- Gendron, S.; Couture, J. und Aoudjit, F. (2003): Integrin alpha2beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 49, S. 48633-43. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13679375.
- Gerard, C. und Rollins, B. J. (2001): Chemokines and disease, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 2, S. 108-15. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11175802.

- Gerrits, H.; van Ingen Schenau, D. S.; Bakker, N. E.; van Disseldorp, A. J.; Strik, A.; Hermens, L. S.; Koenen, T. B.; Krajnc-Franken, M. A. und Gossen, J. A. (2008): Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice, *Genesis* (Band 46), Nr. 5, S. 235-45. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18442043.
- Gommerman, J. L. und Browning, J. L. (2003): Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 8, S. 642-55. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12974479.
- Gonzalez, M.; Mackay, F.; Browning, J. L.; Kosco-Vilbois, M. H. und Noelle, R. J. (1998): The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles, *J Exp Med* (Band 187), Nr. 7, S. 997-1007. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529316.
- Granger, S. W. und Ware, C. F. (2001): Turning on LIGHT, *J Clin Invest* (Band 108), Nr. 12, S. 1741-2. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11748255.
- Graux, C.; Cools, J.; Michaux, L.; Vandenberghe, P. und Hagemeijer, A. (2006): Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast, *Leukemia* (Band 20), Nr. 9, S. 1496-510. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16826225.
- Griffith, A. V.; Fallahi, M.; Nakase, H.; Gosink, M.; Young, B. und Petrie, H. T. (2009): Spatial mapping of thymic stromal microenvironments reveals unique features influencing T lymphoid differentiation, *Immunity* (Band 31), Nr. 6, S. 999-1009. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20064453.
- Gunn, M. D.; Tangemann, K.; Tam, C.; Cyster, J. G.; Rosen, S. D. und Williams, L. T. (1998): A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci USA* (Band 95), Nr. 1, S. 258-63. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9419363.
- Hall, B. M.; Fortney, J. E.; Taylor, L.; Wood, H.; Wang, L.; Adams, S.; Davis, S. und Gibson, L. F. (2004): Stromal cells expressing elevated VCAM-1 enhance survival of B lineage tumor cells, *Cancer Lett* (Band 207), Nr. 2, S. 229-39. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15072833.
- Hargreaves, D. C.; Hyman, P. L.; Lu, T. T.; Ngo, V. N.; Bidgol, A.; Suzuki, G.; Zou, Y. R.; Littman, D. R. und Cyster, J. G. (2001): A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements, *J Exp Med* (Band 194), Nr. 1, S. 45-56. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11435471.
- Harris, A. W.; Pinkert, C. A.; Crawford, M.; Langdon, W. Y.; Brinster, R. L. und Adams, J. M. (1988): The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells, *J Exp Med* (Band 167), Nr. 2, S. 353-71. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3258007.
- Hartmann, T. N.; Grabovsky, V.; Pasvolsky, R.; Shulman, Z.; Buss, E. C.; Spiegel, A.; Nagler, A.; Lapidot, T.; Thelen, M. und Alon, R. (2008): A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells, *J Leukoc Biol* (Band 84), Nr. 4, S. 1130-40. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18653785.
- Heesen, M.; Berman, M. A.; Charest, A.; Housman, D.; Gerard, C. und Dorf, M. E. (1998): Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1, *Immunogenetics* (Band 47), Nr. 5, S. 364-70. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9510554.
- Hochweller, K.; Striegler, J.; Hammerling, G. J. und Garbi, N. (2008): A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells, *Eur J Immunol* (Band 38), Nr. 10, S. 2776-83. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18825750.
- Hoffman, T. L. und Doms, R. W. (1998): Chemokines and coreceptors in HIV/SIV-host interactions, *AIDS* (Band 12 Suppl A), S. S17-26. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9632980.
- Hopken, U. E.; Foss, H. D.; Meyer, D.; Hinz, M.; Leder, K.; Stein, H. und Lipp, M. (2002): Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs, *Blood* (Band 99), Nr. 4, S. 1109-16. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11830455.
- Hopken, U. E.; Wengner, A. M.; Loddenkemper, C.; Stein, H.; Heimesaat, M. M.; Rehm, A. und Lipp, M. (2007): CCR7 deficiency causes ectopic lymphoid neogenesis and disturbed mucosal tissue integrity, *Blood* (Band 109), Nr. 3, S. 886-95. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17018859.

- Husson, H.; Lugli, S. M.; Ghia, P.; Cardoso, A.; Roth, A.; Brohmi, K.; Carideo, E. G.; Choi, Y. S.; Browning, J. und Freedman, A. S. (2000): Functional effects of TNF and lymphotoxin alpha1beta2 on FDC-like cells, *Cell Immunol* (Band 203), Nr. 2, S. 134-43. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11006011.
- Huynh, M. L.; Fadok, V. A. und Henson, P. M. (2002): Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation, *J Clin Invest* (Band 109), Nr. 1, S. 41-50. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11781349.
- Infantino, S.; Moepps, B. und Thelen, M. (2006): Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells, *J Immunol* (Band 176), Nr. 4, S. 2197-207. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16455976.
- Jameson, S. C. (2005): T cell homeostasis: keeping useful T cells alive and live T cells useful, *Semin Immunol* (Band 17), Nr. 3, S. 231-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15826828.
- Janas, M. L. und Turner, M. (2010): Stromal cell-derived factor 1alpha and CXCR4: newly defined requirements for efficient thymic beta-selection, *Trends Immunol* (Band 31), Nr. 10, S. 370-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20829112.
- Janas, M. L.; Varano, G.; Gudmundsson, K.; Noda, M.; Nagasawa, T. und Turner, M. (2010): Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4, *J Exp Med* (Band 207), Nr. 1, S. 247-61. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20038597.
- Janowski, M. (2009): Functional diversity of SDF-1 splicing variants, *Cell Adh Migr* (Band 3), Nr. 3, S. 243-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19287206.
- Janz, M.; Dorken, B. und Mathas, S. (2006): Reprogramming of B lymphoid cells in human lymphoma pathogenesis, *Cell Cycle* (Band 5), Nr. 10, S. 1057-61. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16687930.
- Jin, Z.; Nagakubo, D.; Shirakawa, A. K.; Nakayama, T.; Shigeta, A.; Hieshima, K.; Yamada, Y. und Yoshie, O. (2009): CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells, *Int J Cancer* (Band 125), Nr. 9, S. 2229-35. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19623653.
- Joffre, O.; Nolte, M. A.; Sporri, R. und Reis e Sousa, C. (2009): Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity, *Immunol Rev* (Band 227), Nr. 1, S. 234-47. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19120488.
- Johnston, P. B.; Yuan, R.; Cavalli, F. und Witzig, T. E. (2010): Targeted therapy in lymphoma, *J Hematol Oncol* (Band 3), S. 45. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21092307.
- Jones, R. G.; Parsons, M.; Bonnard, M.; Chan, V. S.; Yeh, W. C.; Woodgett, J. R. und Ohashi, P. S. (2000): Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo, *J Exp Med* (Band 191), Nr. 10, S. 1721-34. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10811865.
- Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Schuler, G.; Knop, J. und Enk, A. H. (2000): Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 9, S. 1213-22. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11067871.
- Juarez, J. und Bendall, L. (2004): SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis, *Histol Histopathol* (Band 19), Nr. 1, S. 299-309. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14702198.
- Juntilla, M. M. und Koretzky, G. A. (2008): Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development, *Immunol Lett* (Band 116), Nr. 2, S. 104-10. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18243340.
- Kalatskaya, I.; Berchiche, Y. A.; Gravel, S.; Limberg, B. J.; Rosenbaum, J. S. und Heveker, N. (2009): AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties, *Mol Pharmacol* (Band 75), Nr. 5, S. 1240-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19255243.
- Kalderon, D. (2005): The mechanism of hedgehog signal transduction, *Biochem Soc Trans* (Band 33), Nr. Pt 6, S. 1509-12. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16246157.
- Katakai, T.; Hara, T.; Sugai, M.; Gonda, H. und Shimizu, A. (2004): Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes, *J Exp Med* (Band 200), Nr. 6, S. 783-95. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15381731.

- Kawaguchi, A.; Orba, Y.; Kimura, T.; Iha, H.; Ogata, M.; Tsuji, T.; Ainai, A.; Sata, T.; Okamoto, T.; Hall, W. W.; Sawa, H. und Hasegawa, H. (2009): Inhibition of the SDF-1 α -CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice, *Blood* (Band 114), Nr. 14, S. 2961-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19657116.
- Kawauchi, K.; Ogasawara, T.; Yasuyama, M.; Otsuka, K. und Yamada, O. (2009): Regulation and importance of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hematologic malignancies, *Anticancer Agents Med Chem* (Band 9), Nr. 9, S. 1024-38. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19663778.
- Keeley, E. C.; Mehrad, B. und Strieter, R. M. (2010): Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization, *Exp Cell Res*. In Eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21040721.
- Keeley, E. C.; Mehrad, B. und Strieter, R. M. (2010): CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases, *Adv Cancer Res* (Band 106), S. 91-111. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20399957.
- Kerjaschki, D.; Regele, H. M.; Moosberger, I.; Nagy-Bojarski, K.; Watschinger, B.; Soleiman, A.; Birner, P.; Krieger, S.; Hovorka, A.; Silberhumer, G.; Laakkonen, P.; Petrova, T.; Langer, B. und Raab, I. (2004): Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates, *J Am Soc Nephrol* (Band 15), Nr. 3, S. 603-12. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14978162.
- Kim, M. G.; Lee, G.; Lee, S. K.; Lolkema, M.; Yim, J.; Hong, S. H. und Schwartz, R. H. (2000): Epithelial cell-specific laminin 5 is required for survival of early thymocytes, *J Immunol* (Band 165), Nr. 1, S. 192-201. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10861052.
- Klein, B.; Zhang, X. G.; Jourdan, M.; Content, J.; Houssiau, F.; Aarden, L.; Piechaczyk, M. und Bataille, R. (1989): Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6, *Blood* (Band 73), Nr. 2, S. 517-26. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2783861.
- Klein, G. und Klein, E. (1985): Evolution of tumours and the impact of molecular oncology, *Nature* (Band 315), Nr. 6016, S. 190-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2987696.
- Kobune, M.; Ito, Y.; Kawano, Y.; Sasaki, K.; Uchida, H.; Nakamura, K.; Dehari, H.; Chiba, H.; Takimoto, R.; Matsunaga, T.; Terui, T.; Kato, J.; Niitsu, Y. und Hamada, H. (2004): Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m^{-/-} repopulating cells, *Blood* (Band 104), Nr. 4, S. 1002-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15105288.
- Koch, A. E.; Polverini, P. J.; Kunkel, S. L.; Harlow, L. A.; DiPietro, L. A.; Elner, V. M.; Elner, S. G. und Strieter, R. M. (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis, *Science* (Band 258), Nr. 5089, S. 1798-801. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1281554.
- Kohout, T. A.; Nicholas, S. L.; Perry, S. J.; Reinhart, G.; Junger, S. und Struthers, R. S. (2004): Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 22, S. 23214-22. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15054093.
- Kraal, G. und Mebius, R. (2006): New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen, *Int Rev Cytol* (Band 250), S. 175-215. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16861066.
- Kremer, K. N.; Humphreys, T. D.; Kumar, A.; Qian, N. X. und Hedin, K. E. (2003): Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 α /CXCL12 chemokine, *J Immunol* (Band 171), Nr. 1, S. 360-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12817019.
- Krupnick, J. G. und Benovic, J. L. (1998): The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 38), S. 289-319. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9597157.
- Kubsch, S.; Graulich, E.; Knop, J. und Steinbrink, K. (2003): Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1, *Eur J Immunol* (Band 33), Nr. 7, S. 1988-97. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12884865.

- Kucia, M.; Jankowski, K.; Reca, R.; Wysoczynski, M.; Bandura, L.; Allendorf, D. J.; Zhang, J.; Ratajczak, J. und Ratajczak, M. Z. (2004): CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion, *J Mol Histol* (Band 35), Nr. 3, S. 233-45. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15339043.
- Kumar, A.; Humphreys, T. D.; Kremer, K. N.; Bramati, P. S.; Bradfield, L.; Edgar, C. E. und Hedin, K. E. (2006): CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells, *Immunity* (Band 25), Nr. 2, S. 213-24. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16919488.
- Kuppers, R. (2009): Molecular biology of Hodgkin lymphoma, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 491-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20008234.
- Kutlesa, S.; Siler, U.; Speiser, A.; Wessels, J. T.; Virtanen, I.; Rousselle, P.; Sorokin, L. M.; Muller, C. A. und Klein, G. (2002): Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms, *Immunology* (Band 105), Nr. 4, S. 407-18. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11985661.
- Kyewski, B. und Derbinski, J. (2004): Self-representation in the thymus: an extended view, *Nat Rev Immunol* (Band 4), Nr. 9, S. 688-98. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15343368.
- Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2001): Regulation of T cell immunity by dendritic cells, *Cell* (Band 106), Nr. 3, S. 263-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11509174.
- Levoye, A.; Balabanian, K.; Baleux, F.; Bachelerie, F. und Lagane, B. (2009): CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling, *Blood* (Band 113), Nr. 24, S. 6085-93. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19380869.
- Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I. und Nourshargh, S. (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat Rev Immunol* (Band 7), Nr. 9, S. 678-89. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17717539.
- Li, M. und Ransohoff, R. M. (2008): Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology, *Prog Neurobiol* (Band 84), Nr. 2, S. 116-31. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18177992.
- Libert, F.; Parmentier, M.; Lefort, A.; Dumont, J. E. und Vassart, G. (1990): Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1, *Nucleic Acids Res* (Band 18), Nr. 7, S. 1917. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2159631.
- Lind, E. F.; Prockop, S. E.; Porritt, H. E. und Petrie, H. T. (2001): Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development, *J Exp Med* (Band 194), Nr. 2, S. 127-34. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11457887.
- Link, A.; Vogt, T. K.; Favre, S.; Britschgi, M. R.; Acha-Orbea, H.; Hinz, B.; Cyster, J. G. und Luther, S. A. (2007): Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells, *Nat Immunol* (Band 8), Nr. 11, S. 1255-65. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17893676.
- Liu, C.; Ueno, T.; Kuse, S.; Saito, F.; Nitta, T.; Piali, L.; Nakano, H.; Kakiuchi, T.; Lipp, M.; Hollander, G. A. und Takahama, Y. (2005): The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymus, *Blood* (Band 105), Nr. 1, S. 31-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15358618.
- Liu, P.; Jenkins, N. A. und Copeland, N. G. (2003): A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations, *Genome Res* (Band 13), Nr. 3, S. 476-84. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12618378.
- Liu, Q.; Zhang, C.; Sun, A.; Zheng, Y.; Wang, L. und Cao, X. (2009): Tumor-educated CD11b^{high}Ia^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I, *J Immunol* (Band 182), Nr. 10, S. 6207-16. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19414774.
- Lopez-Giral, S.; Quintana, N. E.; Cabrerizo, M.; Alfonso-Perez, M.; Sala-Valdes, M.; De Soria, V. G.; Fernandez-Ranada, J. M.; Fernandez-Ruiz, E. und Munoz, C. (2004): Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination, *J Leukoc Biol* (Band 76), Nr. 2, S. 462-71. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15155773.
- Luker, K. E.; Gupta, M.; Steele, J. M.; Foerster, B. R. und Luker, G. D. (2009): Imaging ligand-dependent activation of CXCR7, *Neoplasia* (Band 11), Nr. 10, S. 1022-35. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19794961.

- Lum, L. und Beachy, P. A. (2004): The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers, *Science* (Band 304), Nr. 5678, S. 1755-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15205520.
- Luther, S. A.; Bidgol, A.; Hargreaves, D. C.; Schmidt, A.; Xu, Y.; Paniyadi, J.; Matloubian, M. und Cyster, J. G. (2002): Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis, *J Immunol* (Band 169), Nr. 1, S. 424-33. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077273.
- Lutz, M. B. und Schuler, G. (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?, *Trends Immunol* (Band 23), Nr. 9, S. 445-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12200066.
- Lwin, T.; Crespo, L. A.; Wu, A.; Dessureault, S.; Shu, H. B.; Moscinski, L. C.; Sotomayor, E.; Dalton, W. S. und Tao, J. (2009): Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis, *Leukemia* (Band 23), Nr. 1, S. 170-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18843286.
- Ma, Q.; Jones, D.; Borghesani, P. R.; Segal, R. A.; Nagasawa, T.; Kishimoto, T.; Bronson, R. T. und Springer, T. A. (1998): Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 16, S. 9448-53. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9689100.
- Ma, Q.; Jones, D. und Springer, T. A. (1999): The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment, *Immunity* (Band 10), Nr. 4, S. 463-71. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229189.
- Maclean, K. H.; Dorsey, F. C.; Cleveland, J. L. und Kastan, M. B. (2008): Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis, *J Clin Invest* (Band 118), Nr. 1, S. 79-88. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18097482.
- Maillard, I.; Tu, L.; Sambandam, A.; Yashiro-Ohtani, Y.; Millholland, J.; Keeshan, K.; Shestova, O.; Xu, L.; Bhandoola, A. und Pear, W. S. (2006): The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor, *J Exp Med* (Band 203), Nr. 10, S. 2239-45. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16966428.
- Maldonado, R. A. und von Andrian, U. H. (2010): How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells, *Adv Immunol* (Band 108), S. 111-65. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21056730.
- Mandal, M.; Borowski, C.; Palomero, T.; Ferrando, A. A.; Oberdoerffer, P.; Meng, F.; Ruiz-Vela, A.; Ciofani, M.; Zuniga-Pflucker, J. C.; Screpanti, I.; Look, A. T.; Korsmeyer, S. J.; Rajewsky, K.; von Boehmer, H. und Aifantis, I. (2005): The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival, *J Exp Med* (Band 201), Nr. 4, S. 603-14. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15728238.
- McBride, J. M.; Jung, T.; de Vries, J. E. und Aversa, G. (2002): IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses, *Cell Immunol* (Band 215), Nr. 2, S. 162-72. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12202153.
- McCarthy, D. D.; Summers-Deluca, L.; Vu, F.; Chiu, S.; Gao, Y. und Gommerman, J. L. (2006): The lymphotoxin pathway: beyond lymph node development, *Immunol Res* (Band 35), Nr. 1-2, S. 41-54. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17003508.
- Mebius, R. E. (2003): Organogenesis of lymphoid tissues, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 4, S. 292-303. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12669020.
- Mebius, R. E. und Kraal, G. (2005): Structure and function of the spleen, *Nat Rev Immunol* (Band 5), Nr. 8, S. 606-16. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16056254.
- Mellor, A. L.; Baban, B.; Chandler, P.; Marshall, B.; Jhaver, K.; Hansen, A.; Koni, P. A.; Iwashima, M. und Munn, D. H. (2003): Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion, *J Immunol* (Band 171), Nr. 4, S. 1652-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12902462.
- Mellor, A. L. und Munn, D. H. (2004): IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism, *Nat Rev Immunol* (Band 4), Nr. 10, S. 762-74. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15459668.

- Miao, Z.; Luker, K. E.; Summers, B. C.; Berahovich, R.; Bhojani, M. S.; Rehemtulla, A.; Kleer, C. G.; Essner, J. J.; Nasevicius, A.; Luker, G. D.; Howard, M. C. und Schall, T. J. (2007): CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 40, S. 15735-40. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17898181.
- Misslitz, A.; Pabst, O.; Hintzen, G.; Ohl, L.; Kremmer, E.; Petrie, H. T. und Forster, R. (2004): Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7, *J Exp Med* (Band 200), Nr. 4, S. 481-91. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15302903.
- Mitsiades, C. S.; Mitsiades, N. S.; McMullan, C. J.; Poulaki, V.; Shringarpure, R.; Akiyama, M.; Hideshima, T.; Chauhan, D.; Joseph, M.; Libermann, T. A.; Garcia-Echeverria, C.; Pearson, M. A.; Hofmann, F.; Anderson, K. C. und Kung, A. L. (2004): Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors, *Cancer Cell* (Band 5), Nr. 3, S. 221-30. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15050914.
- Mocellin, S.; Marincola, F. M. und Young, H. A. (2005): Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint, *J Leukoc Biol* (Band 78), Nr. 5, S. 1043-51. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204623.
- Moller, C.; Stromberg, T.; Juremalm, M.; Nilsson, K. und Nilsson, G. (2003): Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma, *Leukemia* (Band 17), Nr. 1, S. 203-10. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12529679.
- Molon, B.; Gri, G.; Bettella, M.; Gomez-Mouton, C.; Lanzavecchia, A.; Martinez, A. C.; Manes, S. und Viola, A. (2005): T cell costimulation by chemokine receptors, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 5, S. 465-71. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15821738.
- Morita, S.; Kojima, T. und Kitamura, T. (2000): Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses, *Gene Ther* (Band 7), Nr. 12, S. 1063-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10871756.
- Moser, B.; Wolf, M.; Walz, A. und Loetscher, P. (2004): Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control, *Trends Immunol* (Band 25), Nr. 2, S. 75-84. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15102366.
- Mueller, S. N. und Germain, R. N. (2009): Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system, *Nat Rev Immunol* (Band 9), Nr. 9, S. 618-29. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19644499.
- Muller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; Barrera, J. L.; Mohar, A.; Verastegui, E. und Zlotnik, A. (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis, *Nature* (Band 410), Nr. 6824, S. 50-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11242036.
- Muller, G.; Hopken, U. E. und Lipp, M. (2003): The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity, *Immunol Rev* (Band 195), S. 117-35. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12969315.
- Murdoch, C. und Finn, A. (2000): Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases, *Blood* (Band 95), Nr. 10, S. 3032-43. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10807766.
- Murphy, L. O.; MacKeigan, J. P. und Blenis, J. (2004): A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration, *Mol Cell Biol* (Band 24), Nr. 1, S. 144-53. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14673150.
- Murphy, P. M. (2001): Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis, *N Engl J Med* (Band 345), Nr. 11, S. 833-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11556308.
- Muschen, M.; Rajewsky, K.; Brauning, A.; Baur, A. S.; Oudejans, J. J.; Roers, A.; Hansmann, M. L. und Kuppers, R. (2000): Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma, *J Exp Med* (Band 191), Nr. 2, S. 387-94. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10637283.
- Nagaraj, S.; Gupta, K.; Pisarev, V.; Kinarsky, L.; Sherman, S.; Kang, L.; Herber, D. L.; Schneck, J. und Gabrilovich, D. I. (2007): Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer, *Nat Med* (Band 13), Nr. 7, S. 828-35. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17603493.

- Nagasawa, T.; Hirota, S.; Tachibana, K.; Takakura, N.; Nishikawa, S.; Kitamura, Y.; Yoshida, N.; Kikutani, H. und Kishimoto, T. (1996): Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCL chemokine PBSF/SDF-1, *Nature* (Band 382), Nr. 6592, S. 635-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8757135.
- Nakahara, H.; Song, J.; Sugimoto, M.; Hagihara, K.; Kishimoto, T.; Yoshizaki, K. und Nishimoto, N. (2003): Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* (Band 48), Nr. 6, S. 1521-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12794819.
- Nelson, P. J. und Krensky, A. M. (2001): Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection, *Immunity* (Band 14), Nr. 4, S. 377-86. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11336683.
- Nerlov, C. (2007): The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control, *Trends Cell Biol* (Band 17), Nr. 7, S. 318-24. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17658261.
- Ngo, V. N.; Cornall, R. J. und Cyster, J. G. (2001): Splenic T zone development is B cell dependent, *J Exp Med* (Band 194), Nr. 11, S. 1649-60. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11733579.
- Nicholson, K. M. und Anderson, N. G. (2002): The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cell Signal* (Band 14), Nr. 5, S. 381-95. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11882383.
- Nilsson, J. A. und Cleveland, J. L. (2003): Myc pathways provoking cell suicide and cancer, *Oncogene* (Band 22), Nr. 56, S. 9007-21. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14663479.
- Nishimoto, N. (2010): Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases, *Clin Pharmacol Ther* (Band 87), Nr. 4, S. 483-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20182422.
- Nishimoto, N. und Kishimoto, T. (2006): Interleukin 6: from bench to bedside, *Nat Clin Pract Rheumatol* (Band 2), Nr. 11, S. 619-26. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17075601.
- Niu, G.; Wright, K. L.; Ma, Y.; Wright, G. M.; Huang, M.; Irby, R.; Briggs, J.; Karras, J.; Cress, W. D.; Pardoll, D.; Jove, R.; Chen, J. und Yu, H. (2005): Role of Stat3 in regulating p53 expression and function, *Mol Cell Biol* (Band 25), Nr. 17, S. 7432-40. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16107692.
- Nolte, M. A.; Belien, J. A.; Schadee-Eestermans, I.; Jansen, W.; Unger, W. W.; van Rooijen, N.; Kraal, G. und Mebius, R. E. (2003): A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp, *J Exp Med* (Band 198), Nr. 3, S. 505-12. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12900524.
- Ogden, S. K.; Fei, D. L.; Schilling, N. S.; Ahmed, Y. F.; Hwa, J. und Robbins, D. J. (2008): G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling, *Nature* (Band 456), Nr. 7224, S. 967-70. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18987629.
- Ohl, L.; Henning, G.; Krautwald, S.; Lipp, M.; Hardtke, S.; Bernhardt, G.; Pabst, O. und Forster, R. (2003): Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs, *J Exp Med* (Band 197), Nr. 9, S. 1199-204. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12732661.
- Ohl, L.; Mohaupt, M.; Czeloth, N.; Hintzen, G.; Kiafard, Z.; Zwirner, J.; Blankenstein, T.; Henning, G. und Forster, R. (2004): CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions, *Immunity* (Band 21), Nr. 2, S. 279-88. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15308107.
- Okada, T.; Ngo, V. N.; Ekland, E. H.; Forster, R.; Lipp, M.; Littman, D. R. und Cyster, J. G. (2002): Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches, *J Exp Med* (Band 196), Nr. 1, S. 65-75. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12093871.
- Ostrand-Rosenberg, S. und Sinha, P. (2009): Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer, *J Immunol* (Band 182), Nr. 8, S. 4499-506. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19342621.
- Otero, C.; Eisele, P. S.; Schaeuble, K.; Groettrup, M. und Legler, D. F. (2008): Distinct motifs in the chemokine receptor CCR7 regulate signal transduction, receptor trafficking and chemotaxis, *J Cell Sci* (Band 121), Nr. Pt 16, S. 2759-67. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18664492.

- Palomero, T.; Lim, W. K.; Odom, D. T.; Sulis, M. L.; Real, P. J.; Margolin, A.; Barnes, K. C.; O'Neil, J.; Neuberg, D.; Weng, A. P.; Aster, J. C.; Sigaux, F.; Soulier, J.; Look, A. T.; Young, R. A.; Califano, A. und Ferrando, A. A. (2006): NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 103), Nr. 48, S. 18261-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17114293.
- Palomero, T.; Sulis, M. L.; Cortina, M.; Real, P. J.; Barnes, K.; Ciofani, M.; Caparros, E.; Buteau, J.; Brown, K.; Perkins, S. L.; Bhagat, G.; Agarwal, A. M.; Basso, G.; Castillo, M.; Nagase, S.; Cordon-Cardo, C.; Parsons, R.; Zuniga-Pflucker, J. C.; Dominguez, M. und Ferrando, A. A. (2007): Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia, *Nat Med* (Band 13), Nr. 10, S. 1203-10. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17873882.
- Pals, S. T.; de Gorter, D. J. und Spaargaren, M. (2007): Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing, *Blood* (Band 110), Nr. 9, S. 3102-11. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17656647.
- Patrussi, L.; Olivieri, C.; Lucherini, O. M.; Paccani, S. R.; Gamberucci, A.; Lanfranccone, L.; Pelicci, P. G. und Baldari, C. T. (2007): p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells, *Blood* (Band 110), Nr. 6, S. 1730-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17537990.
- Peled, A.; Grabovsky, V.; Habler, L.; Sandbank, J.; Arenzana-Seisdedos, F.; Petit, I.; Ben-Hur, H.; Lapidot, T. und Alon, R. (1999): The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow, *J Clin Invest* (Band 104), Nr. 9, S. 1199-211. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10545519.
- Peranzoni, E.; Zilio, S.; Marigo, I.; Dolcetti, L.; Zanovello, P.; Mandruzzato, S. und Bronte, V. (2010): Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition, *Curr Opin Immunol* (Band 22), Nr. 2, S. 238-44. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20171075.
- Plotkin, J.; Prockop, S. E.; Lepique, A. und Petrie, H. T. (2003): Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus, *J Immunol* (Band 171), Nr. 9, S. 4521-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14568925.
- Poli, V. (1998): The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 45, S. 29279-82. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9792624.
- Popov, A. und Schultze, J. L. (2008): IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection, *J Mol Med* (Band 86), Nr. 2, S. 145-60. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17876564.
- Potzinger, H.; Geretti, E.; Brandner, B.; Wabitsch, V.; Piccinini, A. M.; Rek, A. und Kungl, A. J. (2006): Developing chemokine mutants with improved proteoglycan affinity and knocked-out GPCR activity as anti-inflammatory recombinant drugs, *Biochem Soc Trans* (Band 34), Nr. Pt 3, S. 435-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16709180.
- Proudfoot, A. E. (2006): The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions, *Biochem Soc Trans* (Band 34), Nr. Pt 3, S. 422-6. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16709177.
- Rajagopal, S.; Kim, J.; Ahn, S.; Craig, S.; Lam, C. M.; Gerard, N. P.; Gerard, C. und Lefkowitz, R. J. (2010): Beta-arrestin-but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 107), Nr. 2, S. 628-32. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20018651.
- Ramji, D. P. und Foka, P. (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J* (Band 365), Nr. Pt 3, S. 561-75. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12006103.
- Randall, T. D.; Carragher, D. M. und Rangel-Moreno, J. (2008): Development of secondary lymphoid organs, *Annu Rev Immunol* (Band 26), S. 627-50. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18370924.
- Raz, E. und Mahabaleswar, H. (2009): Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view, *Development* (Band 136), Nr. 8, S. 1223-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19304885.
- Rehm, A.; Anagnostopoulos, I.; Gerlach, K.; Broemer, M.; Scheiderei, C.; Johrens, K.; Hubler, M.; Hetzer, R.; Stein, H.; Lipp, M.; Dorken, B. und Hopken, U. E. (2009): Identification of a chemokine receptor profile characteristic for mediastinal large B-cell lymphoma, *Int J Cancer* (Band 125), Nr. 10, S. 2367-74. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19536742.

- Reif, K.; Ekland, E. H.; Ohl, L.; Nakano, H.; Lipp, M.; Forster, R. und Cyster, J. G. (2002): Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position, *Nature* (Band 416), Nr. 6876, S. 94-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11882900.
- Reimann, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Dorr, J. R.; Tabor, V.; Aichele, P.; Stein, H.; Dorken, B.; Jenuwein, T. und Schmitt, C. A. (2010): Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence, *Cancer Cell* (Band 17), Nr. 3, S. 262-72. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20227040.
- Reizis, B. und Leder, P. (2002): Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 3, S. 295-300. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11825871.
- Richmond, A.; Yang, J. und Su, Y. (2009): The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res* (Band 22), Nr. 2, S. 175-86. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19222802.
- Rosenbauer, F. und Tenen, D. G. (2007): Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation, *Nat Rev Immunol* (Band 7), Nr. 2, S. 105-17. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17259967.
- Rossi, D. und Zlotnik, A. (2000): The biology of chemokines and their receptors, *Annu Rev Immunol* (Band 18), S. 217-42. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10837058.
- Rot, A. und von Andrian, U. H. (2004): Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells, *Annu Rev Immunol* (Band 22), S. 891-928. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15032599.
- Rubin, L. L. und de Sauvage, F. J. (2006): Targeting the Hedgehog pathway in cancer, *Nat Rev Drug Discov* (Band 5), Nr. 12, S. 1026-33. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17139287.
- Ruddell, A.; Mezquita, P.; Brandvold, K. A.; Farr, A. und Iritani, B. M. (2003): B lymphocyte-specific c-Myc expression stimulates early and functional expansion of the vasculature and lymphatics during lymphomagenesis, *Am J Pathol* (Band 163), Nr. 6, S. 2233-45. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14633598.
- Sacedon, R.; Diez, B.; Nunez, V.; Hernandez-Lopez, C.; Gutierrez-Frias, C.; Cejalvo, T.; Outram, S. V.; Crompton, T.; Zapata, A. G.; Vicente, A. und Varas, A. (2005): Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis, *J Immunol* (Band 174), Nr. 3, S. 1456-61. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15661904.
- Sallusto, F.; Palermo, B.; Lenig, D.; Miettinen, M.; Matikainen, S.; Julkunen, I.; Forster, R.; Burgstahler, R.; Lipp, M. und Lanzavecchia, A. (1999): Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function, *Eur J Immunol* (Band 29), Nr. 5, S. 1617-25. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10359116.
- Sanchez-Martin, L.; Estechea, A.; Samaniego, R.; Sanchez-Ramon, S.; Vega, M. A. und Sanchez-Mateos, P. (2010): The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression, *Blood* (Band 117), Nr. 1, S. 88-97. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20930067.
- Sasson, S. C.; Smith, S.; Seddiki, N.; Zaunders, J. J.; Bryant, A.; Koelsch, K. K.; Weatherall, C.; Munier, M. L.; McGinley, C.; Yeung, J.; Mulligan, S. P.; Moore, J.; Cooper, D. A.; Milliken, S. und Kelleher, A. D. (2010): IL-7 receptor is expressed on adult pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and other B-cell derived neoplasms and correlates with expression of proliferation and survival markers, *Cytokine* (Band 50), Nr. 1, S. 58-68. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20060740.
- Sato, K.; Yamashita, N.; Baba, M. und Matsuyama, T. (2003): Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells, *Blood* (Band 101), Nr. 9, S. 3581-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12511411.
- Schmitt, C. A. und Lowe, S. W. (2002): Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models, *J Mol Med* (Band 80), Nr. 3, S. 137-46. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11894140.
- Schmitt, T. M. und Zuniga-Pflucker, J. C. (2002): Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro, *Immunity* (Band 17), Nr. 6, S. 749-56. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12479821.
- Schmitz, A. A.; Govek, E. E.; Bottner, B. und Van Aelst, L. (2000): Rho GTPases: signaling, migration, and invasion, *Exp Cell Res* (Band 261), Nr. 1, S. 1-12. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11082269.

- Seitz, V.; Hummel, M.; Marafioti, T.; Anagnostopoulos, I.; Assaf, C. und Stein, H. (2000): Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease, *Blood* (Band 95), Nr. 10, S. 3020-4. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10807764.
- Shields, J. D.; Kourtis, I. C.; Tomei, A. A.; Roberts, J. M. und Swartz, M. A. (2010): Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21, *Science* (Band 328), Nr. 5979, S. 749-52. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20339029.
- Sierro, F.; Biben, C.; Martinez-Munoz, L.; Mellado, M.; Ransohoff, R. M.; Li, M.; Woehl, B.; Leung, H.; Groom, J.; Batten, M.; Harvey, R. P.; Martinez, A. C.; Mackay, C. R. und Mackay, F. (2007): Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 37, S. 14759-64. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17804806.
- Smits, H. H.; de Jong, E. C.; Wierenga, E. A. und Kapsenberg, M. L. (2005): Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity, *Trends Immunol* (Band 26), Nr. 3, S. 123-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15745853.
- Stein, J. V.; Soriano, S. F.; M'Rini, C.; Nombela-Arrieta, C.; de Buitrago, G. G.; Rodriguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Girard, J. P. und Martinez, A. C. (2003): CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway, *Blood* (Band 101), Nr. 1, S. 38-44. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12393730.
- Steinman, R. M. (2003): The control of immunity and tolerance by dendritic cell, *Pathol Biol (Paris)* (Band 51), Nr. 2, S. 59-60. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12801800.
- Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Elner, V. M.; Martonyi, C. L.; Koch, A. E.; Polverini, P. J. und Elner, S. G. (1992): Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization, *Am J Pathol* (Band 141), Nr. 6, S. 1279-84. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1281615.
- Stumm, R. und Holtt, V. (2007): CXCR4 chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain, *J Mol Endocrinol* (Band 38), Nr. 3, S. 377-82. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17339400.
- Sun, X.; Cheng, G.; Hao, M.; Zheng, J.; Zhou, X.; Zhang, J.; Taichman, R. S.; Pienta, K. J. und Wang, J. (2010): CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression, *Cancer Metastasis Rev* (Band 29), Nr. 4, S. 709-22. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20839032.
- Sun, Y.; Cheng, Z.; Ma, L. und Pei, G. (2002): Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 51, S. 49212-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12370187.
- Suresh, P. und Wanchu, A. (2006): Chemokines and chemokine receptors in HIV infection: role in pathogenesis and therapeutics, *J Postgrad Med* (Band 52), Nr. 3, S. 210-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16855325.
- Suzuki, G.; Nakata, Y.; Dan, Y.; Uzawa, A.; Nakagawa, K.; Saito, T.; Mita, K. und Shirasawa, T. (1998): Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus, *Int Immunol* (Band 10), Nr. 8, S. 1049-56. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9723690.
- Szanya, V.; Ermann, J.; Taylor, C.; Holness, C. und Fathman, C. G. (2002): The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7, *J Immunol* (Band 169), Nr. 5, S. 2461-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12193715.
- Tachibana, K.; Hirota, S.; Iizasa, H.; Yoshida, H.; Kawabata, K.; Kataoka, Y.; Kitamura, Y.; Matsushima, K.; Yoshida, N.; Nishikawa, S.; Kishimoto, T. und Nagasawa, T. (1998): The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract, *Nature* (Band 393), Nr. 6685, S. 591-4. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9634237.
- Talora, C.; Campese, A. F.; Bellavia, D.; Pascucci, M.; Checquolo, S.; Groppioni, M.; Frati, L.; von Boehmer, H.; Gulino, A. und Screpanti, I. (2003): Pre-TCR-triggered ERK signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma, *EMBO Rep* (Band 4), Nr. 11, S. 1067-72. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14566327.

- Tarnowski, M.; Grymula, K.; Liu, R.; Tarnowska, J.; Drukala, J.; Ratajczak, J.; Mitchell, R. A.; Ratajczak, M. Z. und Kucia, M. (2010): Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts, *Mol Cancer Res* (Band 8), Nr. 10, S. 1328-43. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20861157.
- Tarnowski, M.; Liu, R.; Wysoczynski, M.; Ratajczak, J.; Kucia, M. und Ratajczak, M. Z. (2010): CXCR7: a new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34(+) progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells, *Eur J Haematol* (Band 85), Nr. 6, S. 472-83. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20887389.
- Till, K. J.; Lin, K.; Zuzel, M. und Cawley, J. C. (2002): The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes, *Blood* (Band 99), Nr. 8, S. 2977-84. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11929789.
- Tokoyoda, K.; Egawa, T.; Sugiyama, T.; Choi, B. I. und Nagasawa, T. (2004): Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development, *Immunity* (Band 20), Nr. 6, S. 707-18. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15189736.
- Tramont, P. C.; Tosello-Tramont, A. C.; Shen, Y.; Duley, A. K.; Sutherland, A. E.; Bender, T. P.; Littman, D. R. und Ravichandran, K. S. (2010): CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection, *Nat Immunol* (Band 11), Nr. 2, S. 162-70. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20010845.
- Tumanov, A. V.; Grivennikov, S. I.; Shakhov, A. N.; Rytsov, S. A.; Koroleva, E. P.; Takeda, J.; Nedospasov, S. A. und Kuprash, D. V. (2003): Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting, *Immunol Rev* (Band 195), S. 106-16. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12969314.
- Turley, S. J.; Fletcher, A. L. und Elpek, K. G. (2010): The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs, *Nat Rev Immunol* (Band 10), Nr. 12, S. 813-25. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21088682.
- Ueno, T.; Saito, F.; Gray, D. H.; Kuse, S.; Hieshima, K.; Nakano, H.; Kakiuchi, T.; Lipp, M.; Boyd, R. L. und Takahama, Y. (2004): CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes, *J Exp Med* (Band 200), Nr. 4, S. 493-505. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15302902.
- Valentin, G.; Haas, P. und Gilmour, D. (2007): The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b, *Curr Biol* (Band 17), Nr. 12, S. 1026-31. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17570670.
- van der Plas, D. C.; Smiers, F.; Pouwels, K.; Hoefsloot, L. H.; Lowenberg, B. und Touw, I. P. (1996): Interleukin-7 signaling in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells and murine BAF3 cells involves activation of STAT1 and STAT5 mediated via the interleukin-7 receptor alpha chain, *Leukemia* (Band 10), Nr. 8, S. 1317-25. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8709637.
- Veis, D. J.; Sentman, C. L.; Bach, E. A. und Korsmeyer, S. J. (1993): Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes, *J Immunol* (Band 151), Nr. 5, S. 2546-54. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8360476.
- Vicari, A. P. und Trinchieri, G. (2004): Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth?, *Immunol Rev* (Band 202), S. 223-36. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15546396.
- Vila-Coro, A. J.; Rodriguez-Frade, J. M.; Martin De Ana, A.; Moreno-Ortiz, M. C.; Martinez, A. C. und Mellado, M. (1999): The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway, *FASEB J* (Band 13), Nr. 13, S. 1699-710. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10506573.
- Vilimas, T.; Mascarenhas, J.; Palomero, T.; Mandal, M.; Buonamici, S.; Meng, F.; Thompson, B.; Spaulding, C.; Macaroun, S.; Alegre, M. L.; Kee, B. L.; Ferrando, A.; Miele, L. und Aifantis, I. (2007): Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia, *Nat Med* (Band 13), Nr. 1, S. 70-7. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17173050.
- von Boehmer, H. und Fehling, H. J. (1997): Structure and function of the pre-T cell receptor, *Annu Rev Immunol* (Band 15), S. 433-52. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9143695.
- Vorwerk, P.; Wex, H.; Hohmann, B.; Mohnike, K.; Schmidt, U. und Mittler, U. (2002): Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Mol Pathol* (Band 55), Nr. 1, S. 40-5. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11836446.

- Vroon, A.; Heijnen, C. J. und Kavelaars, A. (2006): GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation, *J Leukoc Biol* (Band 80), Nr. 6, S. 1214-21. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16943386.
- Wadsworth, S.; Halvorson, M. J. und Coligan, J. E. (1992): Developmentally regulated expression of the beta 4 integrin on immature mouse thymocytes, *J Immunol* (Band 149), Nr. 2, S. 421-8. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1385605.
- Wakkach, A.; Fournier, N.; Brun, V.; Breittmayer, J. P.; Cottrez, F. und Groux, H. (2003): Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo, *Immunity* (Band 18), Nr. 5, S. 605-17. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12753738.
- Wang, J. F.; Park, I. W. und Groopman, J. E. (2000): Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C, *Blood* (Band 95), Nr. 8, S. 2505-13. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10753828.
- Wang, J. M.; Deng, X.; Gong, W. und Su, S. (1998): Chemokines and their role in tumor growth and metastasis, *J Immunol Methods* (Band 220), Nr. 1-2, S. 1-17. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9839921.
- Wang, J.; Seethala, R. R.; Zhang, Q.; Gooding, W.; van Waes, C.; Hasegawa, H. und Ferris, R. L. (2008): Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy, *J Natl Cancer Inst* (Band 100), Nr. 7, S. 502-12. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18364504.
- Wang, J.; Shiozawa, Y.; Wang, Y.; Jung, Y.; Pienta, K. J.; Mehra, R.; Loberg, R. und Taichman, R. S. (2008): The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer, *J Biol Chem* (Band 283), Nr. 7, S. 4283-94. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18057003.
- Ware, C. F. (2005): Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF, *Annu Rev Immunol* (Band 23), S. 787-819. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771586.
- Ware, C. F. (2008): Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways, *Immunol Rev* (Band 223), S. 186-201. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18613837.
- Webster, B.; Ekland, E. H.; Agle, L. M.; Chyou, S.; Ruggieri, R. und Lu, T. T. (2006): Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells, *J Exp Med* (Band 203), Nr. 8, S. 1903-13. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16831898.
- Weil, R. und Israel, A. (2006): Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB, *Cell Death Differ* (Band 13), Nr. 5, S. 826-33. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16439988.
- Weng, A. P. und Aster, J. C. (2004): Multiple niches for Notch in cancer: context is everything, *Curr Opin Genet Dev* (Band 14), Nr. 1, S. 48-54. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15108805.
- Weng, A. P.; Millholland, J. M.; Yashiro-Ohtani, Y.; Arcangeli, M. L.; Lau, A.; Wai, C.; Del Bianco, C.; Rodriguez, C. G.; Sai, H.; Tobias, J.; Li, Y.; Wolfe, M. S.; Shachaf, C.; Felsher, D.; Blacklow, S. C.; Pear, W. S. und Aster, J. C. (2006): c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma, *Genes Dev* (Band 20), Nr. 15, S. 2096-109. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16847353.
- Whelan, J. T.; Ludwig, D. L. und Bertrand, F. E. (2008): HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* (Band 22), Nr. 6, S. 1161-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18337761.
- Williams, C. A.; Harry, R. A. und McLeod, J. D. (2008): Apoptotic cells induce dendritic cell-mediated suppression via interferon-gamma-induced IDO, *Immunology* (Band 124), Nr. 1, S. 89-101. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18067553.
- Wurbel, M. A.; Malissen, M.; Guy-Grand, D.; Meffre, E.; Nussenzweig, M. C.; Richelme, M.; Carrier, A. und Malissen, B. (2001): Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes, *Blood* (Band 98), Nr. 9, S. 2626-32. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11675330.

- Yashiro-Ohtani, Y.; He, Y.; Ohtani, T.; Jones, M. E.; Shestova, O.; Xu, L.; Fang, T. C.; Chiang, M. Y.; Intlekofer, A. M.; Blacklow, S. C.; Zhuang, Y. und Pear, W. S. (2009): Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A, *Genes Dev* (Band 23), Nr. 14, S. 1665-76. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19605688.
- Yoshida, R.; Nagira, M.; Imai, T.; Baba, M.; Takagi, S.; Tabira, Y.; Akagi, J.; Nomiyama, H. und Yoshie, O. (1998): EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC, *Int Immunol* (Band 10), Nr. 7, S. 901-10. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9701028.
- Yu, H.; Pardoll, D. und Jove, R. (2009): STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3, *Nat Rev Cancer* (Band 9), Nr. 11, S. 798-809. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19851315.
- Zabel, B. A.; Wang, Y.; Lewen, S.; Berahovich, R. D.; Penfold, M. E.; Zhang, P.; Powers, J.; Summers, B. C.; Miao, Z.; Zhao, B.; Jalili, A.; Janowska-Wieczorek, A.; Jaen, J. C. und Schall, T. J. (2009): Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands, *J Immunol* (Band 183), Nr. 5, S. 3204-11. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19641136.
- Zaitseva, M.; Romantseva, T.; Manischewitz, J.; Wang, J.; Goucher, D. und Golding, H. (2005): Increased CXCR4-dependent HIV-1 fusion in activated T cells: role of CD4/CXCR4 association, *J Leukoc Biol* (Band 78), Nr. 6, S. 1306-17. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204649.
- Zhang, L.; Lorenz, U. und Ravichandran, K. S. (2003): Role of Shc in T-cell development and function, *Immunol Rev* (Band 191), S. 183-95. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12614360.
- Zhang, M.; Tang, H.; Guo, Z.; An, H.; Zhu, X.; Song, W.; Guo, J.; Huang, X.; Chen, T.; Wang, J. und Cao, X. (2004): Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells, *Nat Immunol* (Band 5), Nr. 11, S. 1124-33. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15475957.
- Zhao, W. L. (2010): Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways, *Leukemia* (Band 24), Nr. 1, S. 13-21. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19865108.
- Zlotoff, D. A.; Schwarz, B. A. und Bhandoola, A. (2008): The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man, *Semin Immunopathol* (Band 30), Nr. 4, S. 371-82. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18925398.
- Zou, Y. R.; Kottmann, A. H.; Kuroda, M.; Taniuchi, I. und Littman, D. R. (1998): Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development, *Nature* (Band 393), Nr. 6685, S. 595-9. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9634238.

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche gekennzeichnet zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich gelesen und akzeptiert.

Angela Mensen

Berlin, den 05.05.2011

Publikationen

Manuskripte:

Angela Mensen, Ioannis Anagnostopoulos, Stefanie Wittstock, Bernd Dörken, Uta.E.Höpken, Armin Rehm

The chemokine receptor CXCR7 is expressed in T cell lymphoblastic leukemia and Hodgkin lymphoma and confers enhanced apoptosis resistance to T cell precursors.

Blood (Eingereicht)

Armin Rehm, **Angela Mensen**, Kristina Schradi, Kerstin Gerlach, Susann Winter, Stefanie Wittstock, Bernd Dörken, Martin Lipp, Uta.E.Höpken

Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs.

Blood (zur Veröffentlichung angenommen)

Mein Anteil an den praktischen Arbeiten zu diesem Manuskript umfasste im Wesentlichen die Experimente zu den gp38⁺ Stromazellen. Hierzu gehörte die durchflusszytometrische und quantitative RT-PCR-Analyse primärer FRCs, die in vitro Kultivierung der FRCs, die Charakterisierung der kultivierten FRCs mit Hilfe der quantitativen RT-PCR und konfokalen Mikroskopie sowie die Verwendung der FRCs für Kokulturen mit primären Eμ-Myc-Lymphomzellen. Darüber hinaus habe ich die Westernblot-Analysen zur CCR7-Signaltransduktion, zur Klonalität und zu Apoptose- und Proliferationsmarkern von Eμ-Myc-Zellklonen durchgeführt.

Posterpräsentationen

- Annual Meeting DGfI, September 22-25, 2010, Leipzig, Germany (Abstract TIS-122)
- 11th PhD-Retreat of the MDC and FMP, September 3-5, 2009, Kremmen
- 10th PhD-Retreat of the MDC and FMP, September 18-20, 2008, Döllnsee-Schorfheide

Angela Mensen

Berlin, den 05.05.2011

Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Betreuern Dr. Armin Rehm und PD Dr. Uta E. Höpken einen ganz besonderen Dank für die Bereitstellung der interessanten Projekte und der hervorragenden Arbeitsbedingungen aussprechen. Ihre ständige Bereitschaft zu Diskussionen, aber auch viele praktische Hilfestellungen haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. med. Bernd Dörken möchte ich danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe meine Arbeit absolvieren konnte, die mir ein exzellentes Forschungsumfeld geboten hat.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Uckert danke ich für die immer sehr freundliche Betreuung und Vertretung meiner Arbeit am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin.

Meinen PhD-Komiteemitgliedern Prof. Dr. Michael Gotthardt und Prof. Dr. Fritz Ratjen möchte ich für die hilfreichen Diskussionen und Vorschläge im Rahmen der jährlichen Sitzungen des PhD-Programmes „Molekulare Zellbiologie“ danken.

Prof. Dr. Carmen Birchmeier und ihren Mitarbeitern Dr. Hagen Wende und Andrea Leschke spreche ich großen Dank für die Beratung zur Generierung der Knockout-Maus und Hilfe bei der ES-Zellkultur aus.

Meinen Kooperationspartnern Dr. med. Richard Ratai vom Helios-Klinikum Berlin-Buch und Prof. Dr. med. Ioannis Anagnostopoulos vom Institut für Pathologie der Charité Berlin danke ich für ihren äußerst wertvollen wissenschaftlichen Beitrag zum CXCR7-Projekt. Auch möchte ich der „FACS Sort Facility“ des Max-Delbrück-Zentrums für ihre stets zuverlässige und saubere Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich meinen Kollegen der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, in der ich mich von Anfang an sehr wohl gefühlt habe. Besonders Jana Wolf, Constantin Rüder, Stefanie Wittstock, aber auch den „Lipp-Mädels“ Susann Winter, Kristina Schradi und Katharina Wichner danke ich für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und die vielen netten wissenschaftlichen, aber auch nicht-wissenschaftlichen Diskussionen. Kerstin Gerlach und Katrin Räbel danke ich für ihre hervorragende technische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich aus tiefstem Herzen meiner Familie, meiner Mutter, meinem Bruder und meinem Freund für ihre immense Geduld und liebevolle Unterstützung danken. Sie haben mir immer den Rücken freigehalten und mir Kraft in schweren Zeiten gegeben. Meinem Vater danke ich im Nachhinein für alles was er mir im Leben mitgegeben hat. Seine Hilfsbereitschaft und sein Fleiß werden mir immer Vorbild im Leben bleiben.